

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abteilung für Molekularpharmakologie

INTERINDIVIDUELLER VERGLEICH DER
EPOXIDHYDRATASE- UND GLUTATHION-S-TRANSFERASEAKTIVITÄT
IN KULTIVIERTEN MENSCHLICHEN HAUTFIBROBLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von
Friedrich K. Tegtmeier
aus Duisburg-Hamborn

Mainz 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abteilung für Molekularpharmakologie

INTERINDIVIDUELLER VERGLEICH DER
EPOXIDHYDRATASE- UND GLUTATHION-S-TRANSFERASEAKTIVITÄT
IN KULTIVIERTEN MENSCHLICHEN HAUTFIBROBLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von
Friedrich K. Tegtmeyer
aus Duisburg-Hamborn

Mainz 1979

Dekan : Prof. Dr. H. Leithoff
1. Gutachter: Prof. Dr F. Oesch
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Jähnchen

Tag der mündlichen Prüfung : 28. November 1979



Abkürzungen

BP-Oxid	- Benzo(a)pyren-4, 5-oxid
BP-Diol	- Trans -4, 5-dihydroxy-4, 5-dihydro-benzo(a)pyren
cpm	- Impulszahl pro Minute
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNCB	- 2, 4-Dnitrochlorbenzol
EH	- Epoxidhydratase
GSH	- Glutathion
GSHT	- Glutathion-S-Transferase
MO	- Monooxygenase
PBS	- Phosphatgepufferte Salzlösung
rpm	- Umdrehungen pro Minute
TCPO	- 1, 1, 1-Trichlorpropen-2, 3-oxid
Tris	- Trishydroximethylaminomethan

INHALT

Kapitel		Seite
1.	<u>EINLEITUNG</u>	7
2.	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	12
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	13
3.1.	Material	13
3.2.	Geräte	14
3.3.	selbst hergestellte Lösungen	15
3.4.	Methoden	16
3.4.1.	Fibroblastenkultur	16
3.4.1.1.	Fibroblastengewinnung und Anzucht der tiefgefrorenen Zellen	16
3.4.1.2.	Subkulturverfahren zur Vermehrung der Zellen	16
3.4.1.3.	Subkulturverfahren zur anschließenden Enzymmessung	17
3.4.2.	Zellaufbereitung zur Enzymmessung	17
3.4.3.	Tiefgefrieren der Zellen	18
3.4.4.	Thymidininkorporation zur Kontrolle der Zellteilungsaktivität	18
3.4.5.	Proteinbestimmung	19
3.4.6.	Enzymmessungen	20
3.4.6.1.	Messung der Epoxidhydratase	20

Kapitel	Seite
3.4.6.2. Messung der Glutathion-S-Transferase mit Benzo(a)pyren-4, 5-oxid als Substrat	21
3.4.6.3. Messung der Glutathion-S-Transferase mit 2, 4-Dinitrochlorbenzol als Substrat	22
4. <u>ERGEBNISSE</u>	
4.1. Entwicklung von Messverfahren für die Epoxidhydratase und die Glutathion-S-Transferase in Humanfibroblasten sowie die Standardisierung der Messungen	23
4.1.1. Linearität des Substratumsatzes der Epoxidhydratase mit Zeit und Protein	23
4.1.2. Charakterisierung der Epoxidhydratase durch 1, 1, 1-Trichlorpropen-2, 3-oxid und α -Naphthoflavin	23
4.1.3. Linearität des Substratumsatzes der Glutathion-S-Transferase mit Zeit und Protein für Benzo(a)pyren-4, 5-oxid als Substrat	27
4.1.4. ... für 2, 4-Dinitrochlorbenzol als Substrat	27
4.1.5. Abhängigkeit der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferaseaktivität von der Zelldichte bzw. der Zellteilungsaktivität	29
4.1.6. Kontrolle der Abhängigkeit der Zellteilungsaktivität vom Dichtewachstum der Fibroblasten anhand der Thymidininkorporation	29
4.2. Intra- und interindividuelle Unterschiede der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferaseaktivität	34
4.2.1. Intraindividuelle Unterschiede der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferaseaktivität	34

Kapitel	Seite
4.2.1.1. Fehler der Einzelmessung durch das Messverfahren	34
4.2.1.2. Einfluß von Einfrieren, Auftauen und Rehomogenisieren der Zellen auf die Messergebnisse	35
4.2.1.3. Unterschiede der Enzymaktivitäten in voneinander unabhängigen Parallelkulturen einer Zelllinie	36
4.2.1.4. Unterschiede der Enzymaktivitäten bedingt durch Unterschiede der Kulturdauer (mehr als zwei Subkulturen Unterschied)	38
4.2.1.5. Unterschiede der Enzymaktivitäten in unabhängigen Fibroblastenkulturen aus verschiedenen Biopsien desselben Donors	38
4.2.2. Interindividuelle Unterschiede der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferaseaktivitäten	43
5. <u>DISKUSSION</u>	56
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	63
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	65
8. <u>DANKSAGUNG</u>	70
9. <u>LEBENS LAUF</u>	71

1. EINLEITUNG

Aufgrund epidemiologischer Studien kann davon ausgegangen werden, daß zur Zeit die malignen Neubildungen mit etwa 20% die zweithäufigste Todesursache in der BRD darstellen (1). Wird heute neben der biologischen und physikalischen, die chemische Ätiologie maligner Tumore mit bis zu über 80% (2) beziffert, erscheint die konsequente Aufklärung von Vorkommen und Wirkungsmechanismen krebserregender Substanzen zwingend notwendig. So weiß man heute, daß nicht nur Industrie- und Autoabgase sowie jegliche Art unvollständiger Verbrennung zur Quelle potentieller karzinogener Stoffe werden, sondern auch Lösungsmittel, Pharmaka und selbst Grundnahrungsmittel, verarbeitet wie unverarbeitet (3). Allein letztere führen schon zu einer jährlichen Aufnahme von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen von bis zu 10 mg/kg Körpergewicht (4). Der zur Bekämpfung von Krebsursachen zu beschreitende Weg kann also nicht nur in der Eliminierung und Reduzierung der Erzeugung und des Gebrauches solcher Substanzen liegen, sondern erfordert die Aufklärung der Wirkungsmechanismen dieser Stoffe sowie der an deren Umbau beteiligten Enzymsysteme zur Auffindung neuer Angriffspunkte für eine effektive Prävention.

Obwohl schon vor 200 Jahren erste Zusammenhänge zwischen der Einwirkung von Ruß und Teer auf menschliche Haut und der Entstehung maligner Tumore erkannt wurden (5), entwickelten Yamagiwa und Ischikawa erst 150 Jahre später die ersten Grundlagen zur experimentellen Untersuchung der chemischen Kanzerogenese (6). Neben der krebserregenden Eigenschaft vieler polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe sind heute bereits Hunderte von Substanzen völlig unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung mit kanzerogener Wirkung bekannt, wie z.B. aromatische Amine, Nitrosamine, Arsenverbindungen, Aflatoxine, Diäthylstilb-östrol und Vinylchlorid. Viele dieser an sich relativ inerten Verbindungen

bedürfen nach Aufnahme in den Körper zuerst eines chemischen Umbaues zu reaktiven Metaboliten, welche an Zellproteine und auch an die genetischen Informationsträger, die DNS und RNS, binden und so ihre zytotoxische, mutagene und kanzerogene Wirkung entfalten (7-9).

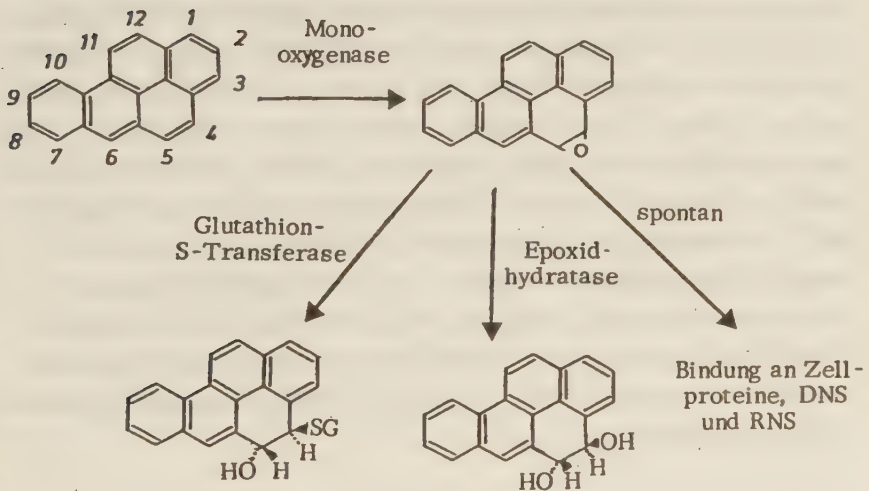
Im Mittelpunkt dieser aktivierenden Reaktionen steht das funktionell hauptsächlich der Ausscheidung lipophiler Substanzen dienende Monooxygenasesystem. Dieses Enzymsystem des endoplasmatischen Retikulums wird in fast allen Tierspezies, einschließlich dem Menschen, und in fast allen Organen gefunden und weist eine sehr breite Substratspezifität auf. Das bedeutet einerseits den Vorteil der effizienten Eliminierung einer großen, sowie relativ heterogenen Gruppe von unpolaren Substanzen, andererseits jedoch das Risiko der Umsetzung mancher Verbindungen zu chemisch elektrophil reaktiven oder anderswie schädlichen Zwischenprodukten. Ein sehr häufig beobachteter Aktivierungsweg ist die Epoxidierung von olefinischen oder aromatischen Doppelbindungen. Solche mehr oder weniger elektrophil reaktive Epoxide werden unter anderem nachgewiesen bei Pharmaka, Pestiziden, Lösungsmitteln und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (10, 11).

Eine derartige Aktivierung bedeutet jedoch nur selten den Endpunkt im Stoffwechsel dieser Verbindungen. Es sind sowohl spontane wie enzymatische Folgereaktionen möglich. In dieser Arbeit werden wir uns mit den zwei wohl wichtigsten Folgeenzymen beschäftigen, der Epoxidhydratase (EH) und der Glutathion-S-Transferase (GSHT) (11-18).

Die EH setzt Epoxide zu Dihydrodiolen um. Sie ist ein membrangebundenes, mikrosomales Enzym. Ihre direkte Nachbarschaft zum aktivierenden Monooxygenasesystem bedeutet eine ideale Lokalisation zur Reaktion mit den lipophilen Epoxiden. Auch die EH läßt sich wie das aktivierende MO-System in den meisten Tierspezies und in den meisten Organen nachweisen (12, 13). Im Gegensatz zur EH sind die GSHT (es gibt mehrere verschiedene Enzyme mit etwas unterschiedlichen Substrat-

spezifitäten) hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Sie setzen neben Epoxiden auch viele andere elektrophil reaktive Substrate um (19, 20).

Das folgende Schema stellt am Beispiel eines polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes die Aktivierung und Inaktivierung durch die beschriebenen Enzymsysteme dar.



EH und GSH werden mit gutem Recht als inaktivierende Enzyme dargestellt. Das gilt aber nicht ohne Einschränkung, da auch diese Enzyme gelegentlich Fehlleistungen erbringen, d.h. gefährlichere statt weniger gefährliche Produkte herstellen. So spielen Dihydrodiole, welche obligat Epoxidhydratase voraussetzen, nach Weitermetabolisierung durch Mono-oxygenasen zu Dihydrodiolepoxiden (welche ungünstigerweise durch die EH nicht inaktiviert werden) eine entscheidende Rolle für die Kanzerogenität verschiedener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (21).

Auch für die GSHT ist ein Fall bekannt, in welchem sie, statt wie üblich zu inaktivieren, selbst den reaktiven Metaboliten erzeugt : 1, 2-Dichloräthan und verwandte Verbindungen bilden durch Konjugation mit GSH mutagene Schwefellostverbindungen (22).

Durch die in den letzten Jahren erreichte, weitgehende Aufhellung der Wirkungsweise und des Vorkommens der inaktivierenden Enzymsysteme, könnten diese nun zum effizienten Angriffspunkt von Modulationen des Umsatzes reaktiver Metabolite werden (23-28). So gehört in diesem Zusammenhang das besondere Interesse der Erklärung von möglichen unterschiedlichen Reaktionsweisen verschiedener Individuen auf gleiche, potentiell karzinogene Noxen. Es besteht die Frage, ob bestimmte Menschen aufgrund ihrer individuell fixierten oder nur temporär durch exogene Einflüsse veränderten metabolischen Situation eher maligne Neoplasien entwickeln als andere. Könnten also spezielle Aktivitätsmuster der beteiligten Enzyme zu maligner Transformation von Zellen prädisponieren ? - Als Beispiel eines Enzymdefektes mit derartigen Folgen ist die Xeroderma Pigmentosum zu nennen (29). Liegt bei dieser Krankheit jedoch der Schaden auf der Ebene der Reparatur einer schon veränderten genetischen Information, so steht für die hier beschriebenen Enzyme die Bildung bzw. der Abbau der zur Veränderung führenden reaktiven Zwischenprodukte im Mittelpunkt.

Um den möglichen Einfluß individuell unterschiedlicher Aktivitäten der EH und GSHT auf die Bildung maligner Tumore erfassen zu können, ist es jedoch notwendig, die Aktivitäten dieser Enzyme im Zellmaterial verschiedener Personen zu messen und zu vergleichen (34-38). Voraussetzung für derartige Messungen aber ist, falls genetische Unterschiede untersucht werden sollen, die weitgehende Unabhängigkeit des zu untersuchenden Systems von exogenen und endogenen Einflüssen, wie z. B. der unterschiedlichen Ernährung (19, 27, 28), der Ingestion von Schadstoffen und Pharmaka sowie von Hormonen und speziellen Stoffwechselsituationen. Diese Bedingungen finden sich nur in einem körperunabhängigen System,

einem in vitro Zellkultursystem, wie es auch zur Untersuchung anderer metabolischer Fragestellungen, wie z. B. für die Aufklärung von genetischen Stoffwechseldefekten, benutzt wird (30). In Anlehnung an derartige Routineverfahren bietet sich für die Durchführung dieser Arbeit das technisch relativ unproblematische und von der zellulären Zusammensetzung her homogene Fibroblastenkultursystem an. Neben dem Vergleich der Enzymaktivitäten und der daraus folgenden Erkenntnisse über den individuell unterschiedlichen Epoxidmetabolismus schaffen die Ergebnisse dieser Arbeit Grundlagen für eventuell folgende Stoffwechsel-, Mutagenitäts- und Transformationsstudien an exemplarischen Humanfibroblastenkulturen.

2. PROBLEMSTELLUNG

Aufgabe dieser Arbeit war es :

1. in kultivierten Hautfibroblasten ausgewählter Personen die Epoxidhydratase und die Glutathion-S-Transferase zu messen und
2. unter der Voraussetzung einer ausreichenden Standardisierungsmöglichkeit der Messmethoden nach eventuell vorhandenen interindividuellen Unterschieden zu suchen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

1. Zellkulturflaschen (75 cm² und 25 cm²)
Fa. Falcon, USA
2. Einmalpipetten und -reagenzgefäße
Fa. Falcon, USA
3. Mikrotitrierplatten für Zellkulturen
Fa. Greiner, Nurtingen, BRD
4. Zellkulturmedium : MEM-Dulbecco's 10x ohne
NaCO₃ und Glutamin
Fa. Seromed, München, BRD
5. Fötale Kälberserum
Fa. Gibco Bio-Cult, Glasgow, GB
6. Glutamin-L 200 mMol 10x
Fa. Seromed, München, BRD
7. Na-Bikarbonat 7,5%
Fa. Seromed, München, BRD
8. Penicillin-Streptomycin 10 000 E/ml
Fa. Seromed, München, BRD
9. Trypsin 2,5% in PBS ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺
Fa. Seromed, München, BRD
10. Pyrogenfreies Wasser für Injektionszwecke
Fa. Schi-wa, Bad Leer-Glandorf, BRD
11. (Methyl-³H)-Thymidin (spezifische Aktivität :
40-60 mCi/mmol)
Fa. Amersham-Buchter, Braunschweig,
BRD
12. (³H)-Benzo(a)pyren-4,5-oxid (spezifische Aktivität :
1,25 mCi/mmol)
Chemisches Labor der Molekularpharmakologie der Universität Mainz, BRD

13. Szintillationsmischung (6g Buthyl-PBD/11 Toluol)

Fa. Roth, Karlsruhe, BRD

14. Rotiszint 22 , Fa. Roth, Karlsruhe, BRD

15. Glutathion 99%, Fa. Sigma, München, BRD

16. Rinderserumalbumin

Fa. Sigma, München, BRD

17. 2,4-Dinitrochlorbenzol 95%

Fa. Sigma, München, BRD

18. Äthanol, Fa. Roth, Karlsruhe, BRD

19. Dimethylsulfoxid

Fa. Merck, Darmstadt, BRD

20. Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

Fa. Merck, Darmstadt, BRD

Alle weiteren Chemikalien waren, wenn nicht anders vermerkt, vom höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

3.2. Geräte

1. Ultraschallhomogenisator, Braun-Sonic 300 S

Fa. Braun-Melsungen, BRD

2. Kühlzentrifuge, Fa. Heraeus Christ, Osterode, BRD

3. Tischzentrifuge, 03 P,

Fa. Hitachi

4. Sterile Arbeitsbank,
Fa. Slee, London, GB
5. Roto-Shake, Fa. Kühner,, Basel, CH
6. Erntegerät für Zellen aus Mikrotitrrierplatten
Fa. Skatron, USA
7. Flüssigkeits-Szintillations-Messgerät, Isocap/300
Fa. Searle Nuclear Chicago Division, USA
8. Spektrophotometer, Modell 25
Fa. Beckmann, USA
9. Inkubator für Zellkulturen
Fa. Wedco, USA

3.3. Lösungen

1. 0,9%ige gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4

NaCl	: 8,00 g/l
KCl	: 0,20 g/l
Na ₂ HPO ₄	: 1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	: 0,20 g/l
Phenolrot	: 0,01 g/l

2. Trypsinlösung

Trypsin (3.1.9.) in PBS (3.2.1.) 1:10 (v/v)

3.4. METHODEN

3.4.1. Fibroblastenkultur

3.4.1.1. Fibroblastengewinnung und Anzucht

Die Zellen wurden von H. Ruediger in Hamburg durch Anzucht aus, in der Regel vom Oberarm der Probanden stammenden Epidermisbiopsiematerial gewonnen (39). Zur Aufbewahrung für spätere Kulturen wurden die Zellen in MEM-Dulbecco's Nährmedium mit 10% Glycerin in Glasampullen zu je 5 Mio. Zellen / 2 ml in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die in dieser Arbeit untersuchten Fibroblasten wurden nach raschem Auftauen in 37°C warmen Wasser durch mehrmaliges Aufsaugen in eine engmündige Pipette voneinander getrennt und anschließend aus einer Waschsuspension von 10 ml Nährmedium bei etwa 1000 rpm abzentrifugiert. Nach Resuspension in 2 ml frischem Medium wurden die Zellen auf 75 cm²-Kulturflaschen, in 15 ml Nährmedium ausgesät und bis zu einer Dichte von 50 000-80 000 Zellen pro cm² bei 2-3 täglich erfolgreichem Mediumwechsel, bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturinkubator angezüchtet.

3.4.1.2. Subkulturverfahren zur Vermehrung der Zellen

Zur Subkultivierung wurden die Fibroblasten nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit 10 ml PBS durch leichtes Hin- und Herbewegen der Kulturflasche gespült und danach mit 0,25%iger Trypsin-PBS-Lösung zur Trennung von der Grundfläche und voneinander für 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufsaugen in eine Pipette voneinander separiert, und durch Zugabe von 10 ml Medium wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins aufgehoben. Nach Abzentrifugieren wurden die Fibroblasten einer Kulturflasche in 2-5 ml Medium resuspendiert und zum weiteren Wachstum auf nun drei Kulturflaschen von

je 75 cm^2 in je 15 ml Medium aufgeteilt und erneut bis zum entsprechenden Dichtewachstum kultiviert.

3.4.1.3. Subkulturverfahren zur anschließenden Enzymmessung

War die Gesamtproteinmenge einer Zelllinie von mindestens 3-5 mg erreicht, welche zur Messung der Enzyme erforderlich war, wurde zu Standardisierungszwecken eine Zellkonzentrierung zur Hemmung der Teilungsaktivität durch Kontaktinhibition vorgenommen. Hierzu wurde bis zur Resuspension der Zellen in frischem Medium wie in 3.4.1.2. verfahren, anschließend jedoch, nach Bestimmung der Zellzahl aus einem Aliquot der Suspension mit einer Neubauerzählkammer, eine Konzentrierung der Zellen von mindestens $200\,000/\text{cm}^2$ vorgenommen. Nach 24-stündiger Kultur wurde das Nährmedium gewechselt, um abgestorbene Zellen und Zellreste sowie angefallene Stoffwechselprodukte zu entfernen und die Fibroblasten letztmalig für weitere 24 Stunden in Kultur zu geben.

3.4.2. Zellaufbereitung zur Enzymmessung

Nach mikroskopischer Feststellung ihres einwandfreien Wachstumszustandes, d.h. der Untersuchung auf lytische Herde mit Zellablösung oder toxischem Zerfall sowie auf bakterielle Infektionen, wurden die Zellen, wie in 3.4.1.2. beschrieben, abgelöst und zentrifugiert. Die folgende Trypanblau-Färbung eines Aliquots zur Überprüfung der Zellvitalität ergab durch Farbstoffausschluß die dem entsprechende Überlebensrate der Fibroblasten. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C , der Temperatur, die während aller Vorbereitungen bis zur Messung eingehalten wurde, zweimal in 10 ml PBS gewaschen, d.h. resuspendiert und abzentrifugiert, um schließlich in 2-3 ml 0,9% iger NaCl-Lösung (mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer auf pH 7,4 eingestellt) homogenisiert zu werden.

Dazu wurden die Zellen für 60 Sekunden unter Kontrolle der Sonden-temperatur des Ultraschallhomogenisators zerkleinert, was anschließend lichtmikroskopisch überprüft wurde. Das auf diese Weise erhaltene Homogenat kam entweder innerhalb einer Stunde zur Messung oder wurde zum Zweck späterer Messungen bei -70°C tiefgefroren aufbewahrt.

3.4.3. Tiefgefrieren der Zellen

Um spätere Neuanzuchtungen einer Zelllinie zu ermöglichen, wurden die Fibroblasten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen zu je 3-5 Mio. / 2 ml Nährmedium unter Zusatz von 10% Glycerin in Glasampullen eingeschmolzen und durch langsame Abkühlung innerhalb von 12 Stunden auf die Endtemperatur von -196°C gebracht.

3.4.4. Thymidininkorporation zur Kontrolle der Zellteilungsaktivität

Die nach dem Verfahren von 3.4 1.2. gewonnenen Zellen wurden derart auf Mikrotitrierplatten verteilt, daß sie als 6-fach-Proben in Konzentrationen von jeweils 52 000, 130 000, 182 000, 234 000 und 286 000 Zellen pro cm^2 in je 0,5 ml Nährmedium pro Titriereinheit zum Wachstum kamen. Nach 12 Stunden wurden jeweils 0,002 mCi (^3H)-Thymidin (spezifische Aktivität : 40-60 Ci/mM) in je 0,01 ml 0,9% iger NaCl-Lösung pro Probe zugegeben und die Zellen danach für weitere 12 Stunden inkubiert.

Nach Absaugen des Mediums und des darin gelösten Thymidins sowie nach einmaligem Spülen der haftenden Zellen mit je 0,5 ml 0,9% iger NaCl-Lösung erfolgte die Ablösung der Fibroblasten von den Titrierplatten mit je 0,2 ml 0,25% iger Trypsin-Lösung. Durch anschließendes Absaugen der Zellen durch Filterpapier mit einem eigens dafür konstruierten Gerät wurden die Fibroblasten von den Platten gewonnen. Die Zellen und ihre Fragmente

mit dem darin inkorporierten (^3H)-Thymidin blieben im Filter hängen, während das freie (^3H)-Thymidin durch das Spülwasser entfernt wurde. Das verbleibende (^3H)-Thymidin der Einzelproben wurde in jeweils 10 ml Rotiszint-22 mittels Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie bestimmt.

3.4.5 Proteinbestimmung

Zu jeder homogenen Probe wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (40) mit einem automatischen Analysiergerät der Firma Technicon durchgeführt. Die dazu benötigten Reagenzien waren :

- A : Alkalilösung : 8,0 g NaOH
21,2 g Na_2CO_3
ad 1000 ml H_2O
- B : Kupferreagenz : 10,0 g CuSO_4
20,0 g Na-Tartrat
ad 1000 ml H_2O
- C : Ciocalteus-
Phenolreagenz : 1 : 5 mit H_2O verdünnt
- D : Wasser

(Allen Reagenzien wurde ein Benetzungsmittel - Technicon Wetting Agent ARW-7 - in einer Konzentration von 1 $^\circ$ /bo zugesetzt).

Für die spektrophotometrische Proteinbestimmung wurden die Proben 1 : 100 in H_2O verdünnt und bei einer Wellenlänge von 750 nm gegen einen Standard von Rinderserum-Albumin gemessen. Über einen Direktschreiber

konnten die Konzentrationen aus den jeweils aufgezeichneten Transmissionswerten errechnet werden.

3. 4. 6. Enzymmessungen

3. 4. 6. 1. Messung der Epoxidhydratase

Zur Bestimmung der EH-Aktivität in Humanfibroblasten wurde nach der Methode von H. Schmassmann et al. (41) gearbeitet. Als Substrat diente hierfür (^3H)-Benzo(a)pyren-4, 5-oxid in einer Lösung von 25 nmol / 0,025 ml Acetonitril. Die Inkubationsansätze für die enzymatische Reaktion waren wie folgt zusammengesetzt : In konische 13 ml-Zentrifugengläschen mit Glas-schliffstopfen wurden jeweils pipettiert :

0,1	ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer
0,2-0,3	ml 0,9%-ige NaCl-Lösung
0,1-0,2	ml Fibroblasten-Homogenat

Das Reaktionsvolumen betrug somit endgültig 0,5 ml .

Die durch Zugabe von 0,025 ml Substratlösung gestartete Reaktion wurde bei 37°C in einem bewegten Wasserbad durchgeführt und nach 30 Minuten durch Zugabe von 3,5 ml Petroläther beendet. Danach wurden die in Eis gekühlten Proben mit 0,5 ml DMSO versetzt und für 3 Minuten auf einem Roto-Shake bei 40 rpm extrahiert. Nach der Phasentrennung durch eine Zentrifugation von 400 g wurde die obere Phase abgesaugt. Diese Extraktion wurde zweimal mit je 3,5 ml Petroläther bei Extraktionszeiten von 5 bzw. 10 Minuten wiederholt. Danach wurde das während der Reaktion entstandene BP-Diol mit 1 ml Äthylacetat für 10 weitere Minuten aus der Probe extrahiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation wurden 0,5 ml der oberen Äthylacetatphase in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 6 ml Szintillations-

flüssigkeit (6g Butyl-PBD in 1 l Toluol) versetzt. Für den Leerwert wurde das Fibroblastenhomogenat 10 Minuten gekocht und ansonsten gleich verfahren wie mit der aktiven Präparation. Die spezifische Enzymaktivität ließ sich unter Berücksichtigung der Extraktionsausbeute (ca. 80 %), der spezifischen Aktivität des Substrates, der eingesetzten Proteinmenge, der Inkubationszeit, des zur Szintillationsspektrometrie verwendeten Aliquots und der gemessenen Radioaktivität errechnen.

3.4.6.2. Messung der Glutathion-S-Transferase mit Benzo(a)pyren-4,5-oxid als Substrat

Dieser Bestimmung der GSHT-Aktivität wurde die Methode von Glatt und Oesch zugrunde gelegt (20). Die Substratlösung enthielt 100 nmol BP-oxid (13 mCi/mmol) in / 0,025 ml DMSO. Die eisgekühlten Inkubationsansätze in 6 ml Zentrifugengläschen mit Schliffstopfen waren wie folgt zusammengesetzt :

0,025-0,1	ml Zellhomogenat (12 mg Protein/ml)
0,5	ml Na-Phosphat-Puffer (0,2 M ; pH 7,5)
0,2-0,275	ml KCl-Lösung (0,75 M)
0,2	ml GSH-Lösung (25 mM in H ₂ O)
0,02	ml Substratlösung (1,5 mg BP-oxid in 1 ml DMSO)

Zur Messung wurde die Reaktion nach 1-minütiger Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe von 0,02 ml Substratlösung gestartet. Der Reaktionsabbruch erfolgte nach 2-12 Minuten durch Zusatz von 2 ml Äthylacetat und Abkühlung der Gefäße im Eisbad. Es folgte eine zweimalige Extraktion wie in 3.4.6.1. beschrieben, mit jeweils 2 ml Äthylacetat, um die schlechter wasserlöslichen Metabolite abzutrennen. Nach Absaugen der oberen Äthylacetat Phase wurden 0,5 ml der wässrigen Phase in 10 ml Szintillationsgemisch, Rotiszint 22, überführt und gemessen. Hierbei ergab sich die Gesamtzählrate A. Da die wässrige Phase neben GSH-Konjugaten noch weitere BP-Metabolite enthielt, wurden folgende Blindwerte berücksichtigt :

B : Inkubation mit Puffer, BP-oxid, ohne GSH

C : Inkubation mit Puffer, BP-oxid mit GSH

D : Inkubation mit Puffer, BP-oxid ohne GSH
mit Zellhomogenat

Die nur durch das enzymatisch entstandene GSH-Konjugat verursachte Zählrate X errechnete sich demnach als : $X = A + B - C - D$

3.4.6.3. Bestimmung der Glutathion-S-Transferase mit 2,4-Dinitrochlorbenzol als Substrat

Bei dieser Messung der GSHT nach Habig et al. (42) wurde die Produktbildung direkt spektrophotometrisch verfolgt. Bei einer Reaktionstemperatur von 20°C und einer Wellenlänge von 340 nm wurde die enzymatische Umsetzung von 2,4-Dinitrochlorbenzol in das entsprechende GSH-Konjugat gegen einen Blindwert ohne aktives Protein während 2-4 Minuten unter direkter Mitschreibung der Extinktion gemessen. Der Inkubationsansatz enthielt bei einem Volumen von 2,5 ml :

0,1 mM 2,4-Dinitrochlorbenzol

1,0 mM GSH

10,0 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 6,5

Zellhomogenat (0,05-0,2 mg Protein)

(Das Substrat wurde vor Gebrauch zweimal in Äthanol/Wasser umkristallisiert)

4. ERGEBNISSE

4.1. Entwicklung von Messverfahren für die Epoxidhydratase und die Glutathion-S-Transferase in Humanfibroblasten sowie die Standardisierung der Messungen

4.1.1. Linearität des Substratumsatzes der Epoxidhydratase mit Zeit und Protein

Um unter vergleichbaren Bedingungen eindeutige Aussagen über die Enzymaktivität machen zu können, wurde zuerst überprüft, ob es sich für dieses Zellhomogenat, wie für andere Organaufbereitungen, um eine lineare Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Reaktionszeit handelte. Hierfür wurden, wie Abbildung 1 zeigt, Inkubationszeiten von 10, 20, 30 und 40 Minuten gewählt. Die für die späteren Messungen eingesetzte Standardreaktionszeit von 30 Minuten erfüllte die Bedingungen der linearen Zeitabhängigkeit der Reaktion und ermöglichte einen ausreichenden Substratumsatz schon bei einer Proteinmenge von 0,05 mg (die enzymatische Produktbildung lag unter diesen Bedingungen mindestens um das Zweifache über dem mitgeführten Leerwert). Auch ergab sich für die Abhängigkeit der Reaktion von der Proteinkonzentration, für den in Frage kommenden Bereich, die erwünschte Linearität (Abb. 2).

4.1.2. Charakterisierung der EH durch 1,1,1-Trichlorpropen-2,3-oxid und α -Naphthoflavon

1,1,1-Trichlorpropen-2,3-oxid (TCPO) ist der stärkste bekannte Inhibitor der EH. Er wirkt schon in sehr niedrigen Konzentrationen. Deshalb wurde die Inhibition mit TCPO als ein Kriterium der Validität dieser Messung durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Fibroblasten, wie in 3.4.2. beschrieben, vorbereitet und nach Zusatz verschiedener Mengen TCPO ihre

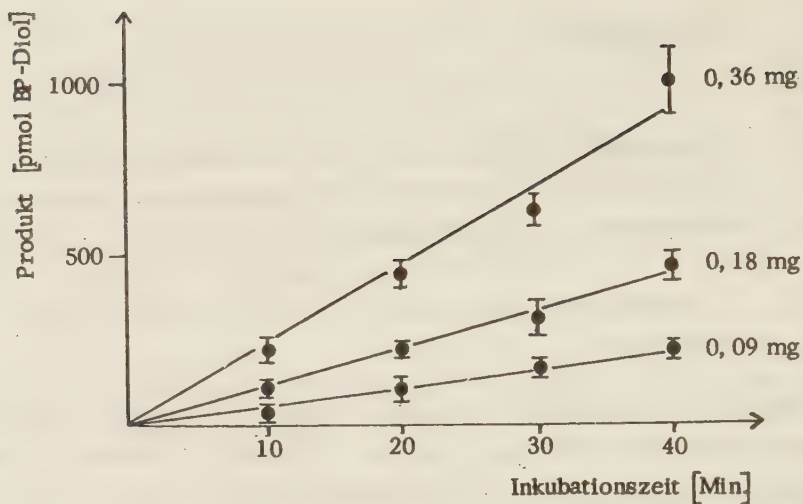


Abb. 1 : Abhängigkeit der BP-Diol-Bildung von der Inkubationszeit bei verschiedenen Proteinkonzentrationen

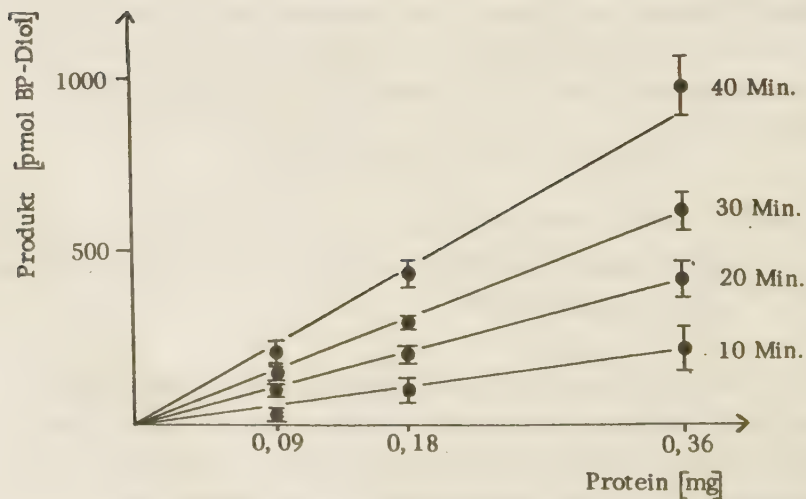


Abb. 2 : Abhängigkeit der BP-Diol-Bildung von der Proteinkonzentration bei verschiedenen Inkubationszeiten

EH-Aktivität bestimmt. Hier ergaben sich bei einer Konzentration von 0,05 mM TCPO im Inkubationsansatz eine Hemmung der EH von 86%, die sich durch weitere Konzentrationserhöhung auf 1 mM TCPO bis auf 96% steigern ließ (Abb. 3).

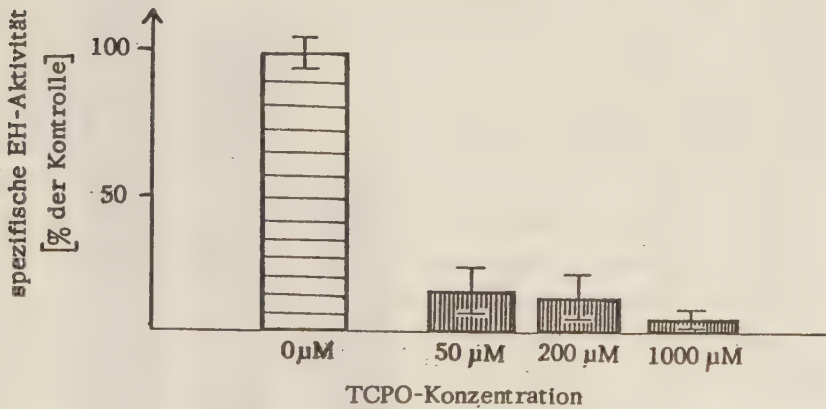


Abb. 3 : Abhängigkeit der EH-Aktivität von der TCPO-Konzentration. Die Messdauer betrug 30 Minuten, die Aktivität ist in % des gemessenen Kontrollumsatzes ohne TCPO angegeben.

Durch den Einsatz von α -Naphtoflavon in das Inkubationsgemisch, welches in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, ergab sich bei sonst gleichem Versuchsaufbau wie in 3.4.6.1. folgendes Resultat : Wie Abb. 4 zeigt, erhöhte α -Naphtoflavon bereits bei einer Konzentration von 1 μ M die EH-Aktivität merkbar (1,4-fach). Bei höheren Konzentrationen von 5 μ M und 20 μ M wurde die Aktivierung auf das 2,1- bzw. 2,4-fache der Kontrollaktivität verstärkt. Der bekannte aktivierende Einfluß von DMSO auf die EH um etwa 7% der Ausgangsaktivität wurde durch eine separate Inkubation erfaßt und bei der Berechnung der Aktivitätssteigerung vom Gesamtumsatz abgezogen.

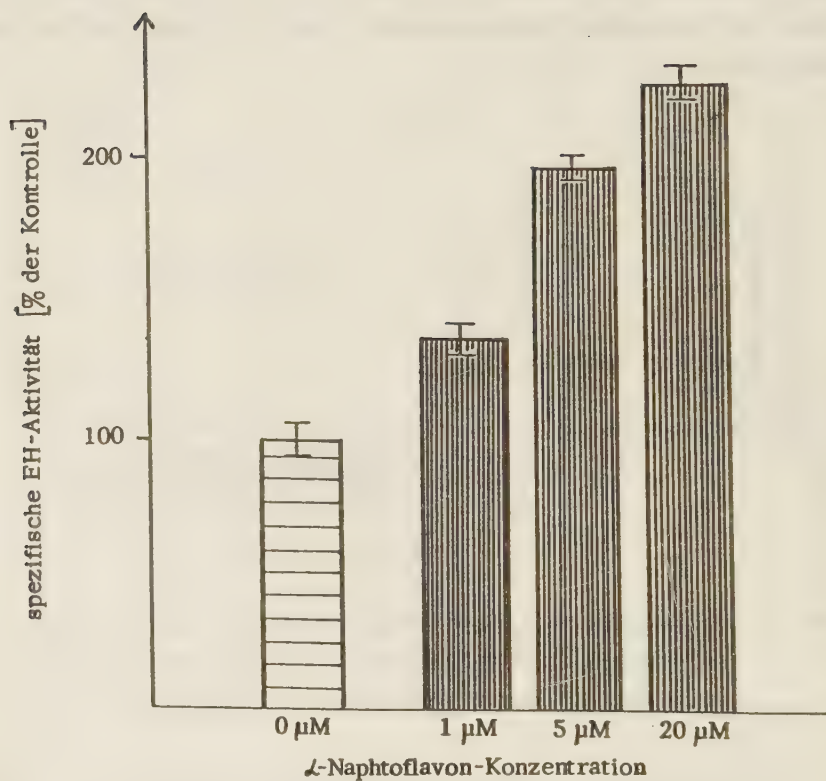


Abb. 4 : Abhängigkeit der EH-Aktivität von der $\mathcal{L}$ -Naphtoflavon-Konzentration. Die Messdauer betrug 30 Minuten, die Aktivität ist in % des Kontrollumsatzes ohne $\mathcal{L}$ -Naphtoflavon angegeben.

4.1.3. Linearität des Substratumsatzes der Glutathion-S-Transferase mit Zeit und Protein für Benzo(a)pyren-4, 5-oxid als Substrat

Da BP-Oxid, das Substrat für die EH-Messung, auch von der GSHT umgesetzt wird, bot es sich in Hinblick auf einen Vergleich beider Enzyme an, dieses als Substrat für die Messung einzusetzen. Nach der Methode von Glatt und Oesch (21), die in 3.4.6.2 beschrieben ist, war es möglich durch Reaktionszeiten von mehr als 4 Minuten und einem Proteineinsatz von mindestens 0,3 mg/Inkubation einen ausreichenden Substratumsatz über dem mitgeführten Leerwert zu erhalten. Doch war die Abhängigkeit der enzymatischen Produktbildung von der Reaktionszeit und dem Proteineinsatz für diesen Bereich nicht linear. Bei kürzeren Inkubationszeiten als 4 Minuten und gleicher Proteinkonzentration hoben sich die enzymatischen Substratumsätze maximal um weniger als 50% vom Leerwert ab. Wurden jedoch zur Umsatzerhöhung größere Proteinmengen eingesetzt, ergaben sich wesentlich weitere Streuungen für die Einzelmessungen, was aus einer schlechteren Phasentrennung und Produktextraktion resultierte. Außerdem war auch für diesen Bereich die lineare Abhängigkeit der Reaktion von der eingesetzten Proteinmenge nicht gegeben. Eine GSHT-Bestimmung mit BP-Oxid, wie sie für andere Organaufbereitungen ihre routinemäßige Anwendung findet, war daher für Fibroblasten mit dem hierfür zur Verfügung stehenden Substrat und unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

4.1.4. Messung der Glutathion-S-Transferase mit 2, 4-Dinitrochlorbenzol als Substrat

Eine weitere Möglichkeit, die Enzymaktivität der GSHT zu bestimmen, bot die Durchführung der Reaktion mit 2, 4-Dinitrochlorbenzol (DNCB) als Substrat. Wie die Abbildungen 5 und 6 zeigen, verläuft die Substratumsetzung über einen Zeitraum von mindestens 4 Minuten und in einem Proteinkonzentrationsbereich von 0,06-0,48 mg / Inkubation linear (Abb. 5 und 6).

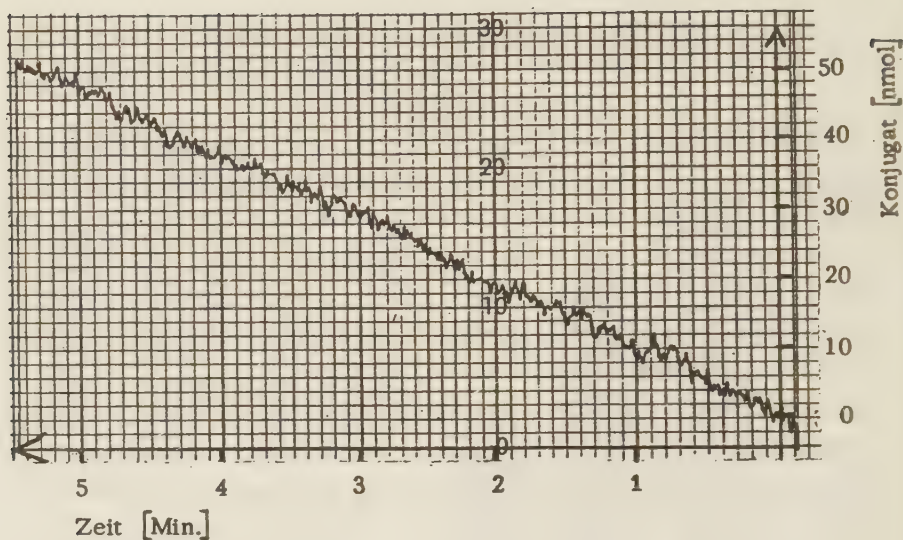


Abb. 5 : Abhängigkeit der Substratkonjugation von der Reaktionszeit
(Versuchsbedingungen siehe 3.4.6.3. Proteineinsatz 0,2 mg)

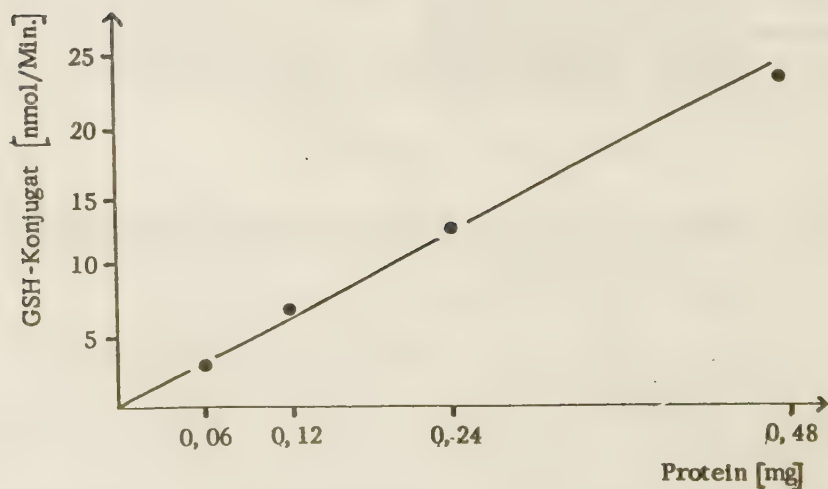


Abb. 6 : Abhängigkeit der Substratkonjugation von der eingesetzten Proteinmenge.

4.5.1. Abhängigkeit der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferase-aktivität von der Zelldichte bzw. der Zellteilungsaktivität

Nach dem Aufbau der Messverfahren zur Erfassung der EH- und GSHT-Aktivität ergab sich durch das unterschiedliche Dichtewachstum und somit der Teilungsaktivität der Zelllinien die Frage nach dem Einfluß dieses Faktors auf die zu messenden Enzyme. Um dieses Problem abzuklären, wurden Zellkulturen von 4 Personen angelegt und 48 Stunden vor der Messung auf je 3 unterschiedliche Zellkonzentrationen von 50 000, 100 000 und 200 000 / cm² subkultiviert. Nach dem üblichen, in 3.4.1.3. und 3.4.2. beschriebenen, Kultur- und Aufbereitungsverfahren zeigten die jeweiligen Enzymmessungen die folgenden Ergebnisse :

Wie die Abbildungen 7 und 8 darstellen, werden die Aktivitäten der EH und GSHT deutlich durch die Zelldichte auf den Kulturplatten beeinflusst. Hierbei geht in jedem Falle die höchste Zelldichte, d. h. die niedrigste Zellteilungsrate, mit den höchsten Enzymaktivitäten, die niedrigste Zellzahl pro cm² mit den geringsten Substratumsätzen einher. Beide Enzyme verhalten sich also in bezug auf die Zellteilungsaktivität gleich; die jeweiligen mittleren Enzymaktivitäten korrelieren jedoch nicht miteinander.

4.1.6. Kontrolle der Abhängigkeit der Zellteilungsaktivität vom Dichtewachstum der Fibroblasten mittels der Thymidininkorporation

Im vorangehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß die EH- und GSHT-Aktivitäten beträchtlich mit der Zelldichte variierten. Je nach Zelllinie unterschieden sich sowohl die EH- wie auch die GSHT-Aktivitäten bis um das Zweifache bei den verschiedenen Zelldichten. Andererseits sieht man aus den Abbildungen 7 und 8, daß die interindividuellen Aktivitätsunterschiede (bei gleicher Zelldichte) ebenfalls in der gleichen Größenordnung variieren. Es stellt sich nun die Frage, ob derartige Unterschiede nur Ausdruck individuell unterschiedlicher Teilungsaktivitäten der einzelnen Zelllinien sind.

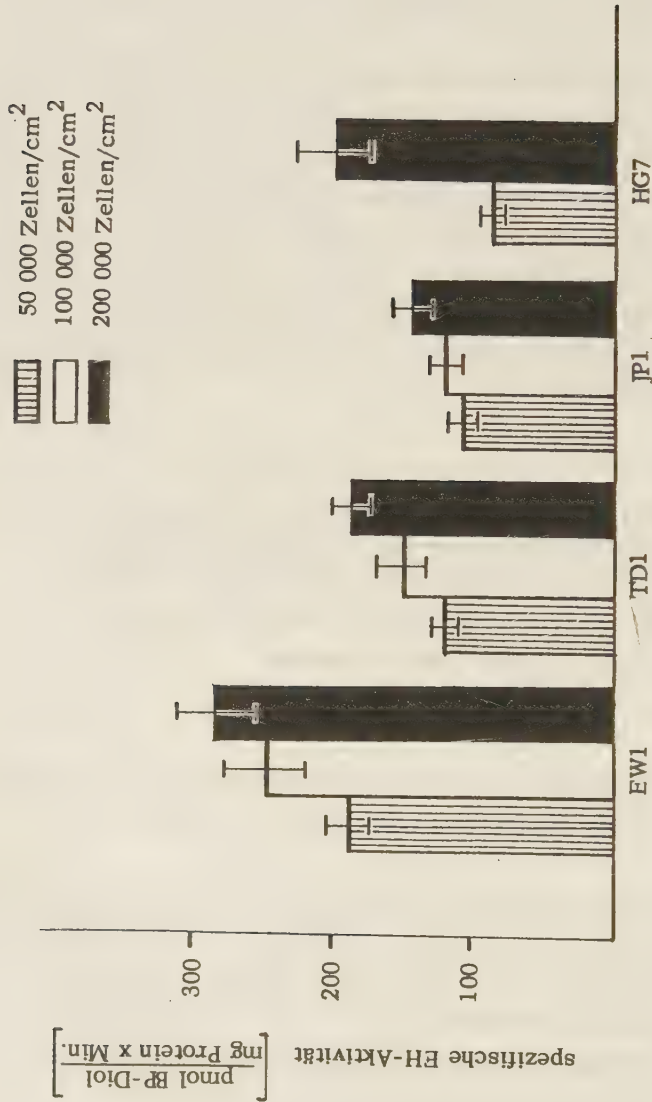


Abb. 7 : Abhängigkeit der EH-Aktivität von der Zelldichte für 3 verschiedene Zellkonzentrationen und 4 verschiedene Zelllinien.

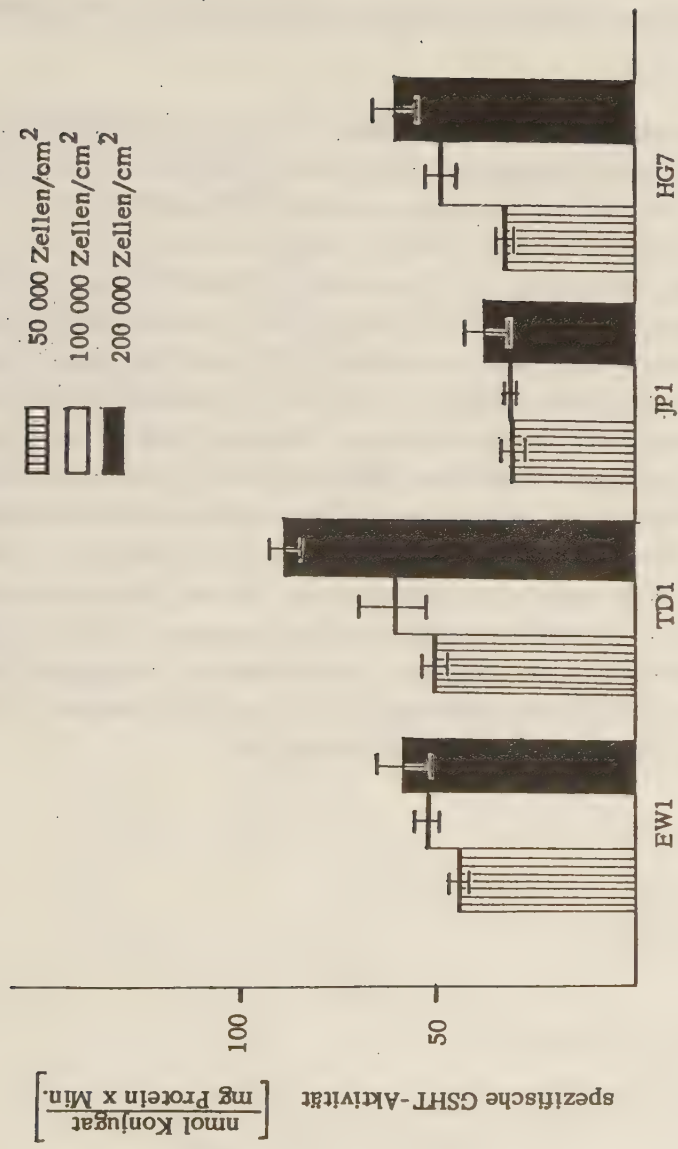


Abb. 8 : Abhängigkeit der GSHT-Aktivität von der Zelldichte für 3. verschiedene Zellkonzentrationen und 4 verschiedene Zelllinien.

Diese könnten zum Beispiel die Folge verschieden starker Kontaktinhibition darstellen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Fibroblasten verschiedener Personen in 5 Konzentrationen auf Zelldichten von 52 000, 130 000, 182 000, 234 000 und 286 000 / cm² kultiviert, um so die Teilungsaktivität der einzelnen Zelllinien vergleichen zu können. Hierbei ergab sich, daß zwar, wie aus Abbildung 9 hervorgeht, die Thymidinaufnahme der Zellen mit zunehmender Dichte geringer wird, doch blieb auch bei den höchsten Konzentrationen eine gewisse individuell gering unterschiedliche Thymidininkorporation erhalten. Die in hohen Konzentrationsbereichen (über 200 000 Zellen/cm²) beobachteten Unterschiede betrugen jedoch nur noch einen Bruchteil der Unterschiede bei niedrigeren Zelldichten. Somit würde eine Konzentrationsänderung um die gleiche Zellzahl bei geringeren Dichten einen wesentlich größeren Einfluß auf die Enzymaktivitäten ausüben, als bei hohen Zelldichten. Für den Bereich über 200 000/cm² ergab sich dagegen der Nachteil eines schlechteren Anwachsens der suspendierten Zellen auf dem Plattengrund, was die Aufnahme ihres normalen Funktionsstoffwechsels beeinträchtigte. Eine günstige Zellzahl für eine standardisierte Messung der EH- und GSHT-Aktivität in Humanfibroblasten liegt also bei etwa 200 000 Zellen / cm².

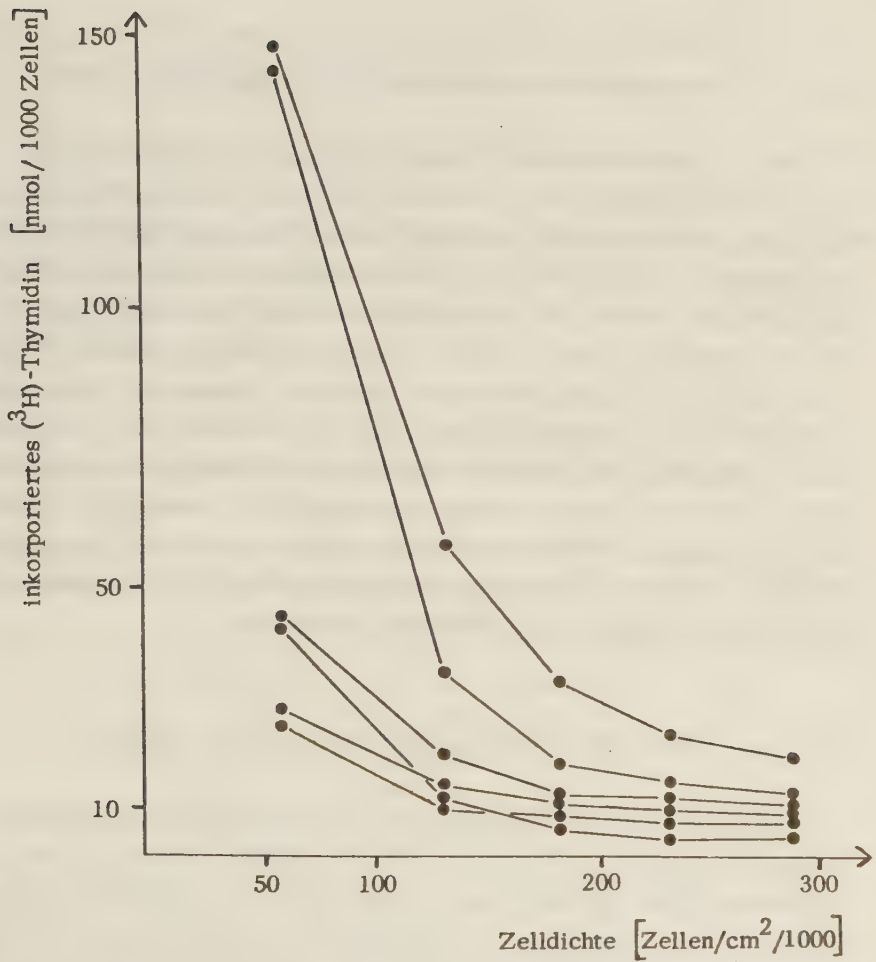


Abb. 9 : Thymidininkorporation 6 verschiedener Zelllinien in Abhängigkeit von der Zelldichte.

4.2. Intra- und interindividuelle Unterschiede der EH- und GSHT-Aktivität

4.2.1. Intraindividuelle Unterschiede der EH- und GSHT-Aktivität

Um die Fragestellung dieser Arbeit, die Abklärung interindividueller Enzymaktivitätsunterschiede, beantworten zu können, war es zur Auffindung auch geringer Unterschiede notwendig, die Reliabilität des Messverfahrens zu überprüfen. Das bedeutete für diese Untersuchungen die Kontrolle der Stabilität bzw. Konstanz der Messergebnisse für die Fibroblasten einer bestimmten Person in bezug auf Fehler durch die Messung selbst und durch die Lagerung und dem damit verbundenen Einfrieren, Auftauen und Rehomogenisieren der Zellen. Weiterhin wurden Fehlermöglichkeiten durch exogene Einflüsse während des Anlegens einer Kultur sowie die Einflüsse weiterer Subkulturen derselben Zelllinie auf deren Enzymaktivitäten untersucht. Schließlich erschien es zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig, eventuell vorbestehende Aktivitätsunterschiede in Fibroblastenlinien verschiedener Biopsien derselben Person festzustellen.

4.2.1.1. Fehler der Einzelmessung durch das Messverfahren

Anfänglich zeigten die Messungen der EH und GSHT hohe Standardabweichungen und eine im Verhältnis zu den Routinemessungen in Mikrosomen verschiedener Organe schlechte Reproduzierbarkeit. Eine Verminderung dieser Streubreite wurde durch eine Verlängerung der Homogenisierungszeit von 30 auf 60 Sekunden erreicht, da unter dieser Bedingung eine gleichmäßigere Zellzerkleinerung und somit neben einer erleichterten Substratzugänglichkeit für die EH auch eine verbesserte Metabolitenextraktion während des Messverfahrens vorlag. Die nach dieser Änderung verbleibende Steigung konnte für die EH-Messung, welche mit je 2 Inkubationen für 2 Proteinkonzentrationen pro Zelllinie durchgeführt wurde, durchschnittlich bei 3,9% gehalten werden.

Für die GSHT-Messung betrug dieser Fehler durchschnittlich 3,6%.

4.2.1.2. Einfluß von Einfrieren, Auftauen und Rehomogenisieren der Zellen auf die Messergebnisse

Zur Bestimmung dieser Faktoren wurden die Aktivitäten der EH und GSHT in Fibroblastenhomogenaten von 5 bzw. 6 Personen direkt sowie nach 8 bzw. 2 Wochen Lagerung bei -20°C , nach Ultraschallhomogenisierung von 20 Sekunden, unter Standardbedingungen gemessen. Hierbei ergaben sich, wie die Tabellen 1 und 2 zeigen, Abweichungen von durchschnittlich 3,8 und 5,7% für die EH bzw. die GSHT.

Tabelle 1 : Einfluß von Lagerung bei -20°C auf die EH-Aktivität

Proband Nr.	EH-Aktivität [pmol BP-Diol/mg protein/ Min.]		Abweichung [%]
	frisch	gelagert	
1	126,7 $\pm$ 6,5	124,7 $\pm$ 10,2	- 1,6
2	128,0 $\pm$ 11,3	124,2 $\pm$ 6,2	- 3,0
3	149,1 $\pm$ 18,9	163,0 $\pm$ 11,1	+ 9,3
4	104,7 $\pm$ 8,2	95,7 $\pm$ 9,2	- 8,6
5	112,3 $\pm$ 9,9	107,6 $\pm$ 10,9	- 4,2
Mittel			- 1,6

Die erste Messung erfolgte mit frischem Zellhomogenat nach Aufbereitung unter Standardbedingungen; die zweite Messung wurde mit einem Aliquot derselben Proben nach 8 Wochen Lagerung bei -20°C durchgeführt. Die mittlere Varianz betrug 3,8 % der entsprechenden mittleren Aktivitäten.

Tabelle 2 : Einfluß von Lagerung bei -20°C auf die GSHT-Aktivität

Proband Nr.	GSHT-Aktivität [nmol GSH-Konjugat/ mg Protein/ Min.]		Abweichung [%]
	frisch	gelagert	
1	60,0	67,3	+ 12,2
1, 29. SK	75,3	72,0	- 4,4
6	65,3	58,6	- 10,3
30	51,2	51,4	+ 0,4
36	50,2	56,0	+ 11,6
37	60,7	67,3	+ 12,2
Mittel			+ 3,6

Lagerung der Proben für 2 Wochen bei -20°C , weitere Bedingungen wie in Tabelle 1. Die mittlere Varianz betrug 5,7% der entsprechenden mittleren Aktivitäten.

4.2.1.3. Unterschiede der Enzymaktivitäten in voneinander unabhängigen Parallelkulturen einer Zelllinie

Um die durch die Vorbereitungen zur Anzüchtung, wie Auftauen, Zentrifugieren und Plattieren, und die beiden ersten Subkulturen bedingten Unterschiede der Enzymaktivitäten zu erfassen, wurden von 4 Personen gleichzeitig jeweils 2 unabhängige Kulturen angelegt. Diese wurden zur Gewinnung genügend großer Proteinmengen zweimal subkultiviert und, wie oben beschrieben, vorbereitet und gemessen. Die hieraus resultierenden maximalen Abweichungen lagen, wie die Tabellen 3 und 4 zeigen, bei Werten für die EH bzw. die GSHT von durchschnittlich 2,8 bzw. 6,6%.

Tabelle 3 : Unterschiede der EH-Aktivität in voneinander unabhängigen Parallelkulturen einer Zelllinie

Proband Nr.	EH-Aktivität [pmol BP-Diol/mg Protein/Min.]		Varianz [%]
	Kultur 1	Kultur 2	
1	197,2 ± 2,8	204,7 ± 21,3	2,6
7	283,1 ± 15,3	285,5 ± 34,0	0,6
10	187,4 ± 10,7	182,6 ± 10,0	1,8
11	144,9 ± 7,8	136,4 ± 17,5	4,3

Messung der EH-Aktivität bei zwei parallel angelegten Kulturen der Fibroblastenlinien von 4 Probanden nach 2 Subkulturen. Die mittlere Varianz betrug 2,3% der mittleren Aktivitäten.

Tabelle 4 : Unterschiede der GSHT-Aktivität in voneinander unabhängigen Parallelkulturen einer Zelllinie.

Proband Nr.	GSHT-Aktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Protein/Min.]		Varianz [%]
	Kultur 1	Kultur 2	
1	62,2	59,1	3,6
7	55,0	63,4	10,0
10	90,0	88,5	1,2
11	41,1	34,9	11,5

Messbedingungen siehe Tab. 3 ; die mittlere Varianz betrug 6,6 % der mittleren Aktivitäten.

4.2.1.4. Unterschiede der Enzymaktivitäten bedingt durch Unterschiede der Kulturdauer (mehr als 2 Subkulturen Unterschied)

Da die parallele Anzüchtung aller zu untersuchenden Zelllinien technisch nicht möglich war, außerdem die verschiedenen Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten variierten (wie die Versuche in 4.1.5. und 4.1.6. zeigten), war es notwendig, die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse nach unterschiedlicher Anzahl von Subkulturen zu überprüfen. Weiterhin konnte durch diesen Versuch geprüft werden, ob sich mit zunehmender Kulturdauer die Enzymaktivitäten der EH und der GSHT durch exogene Einflüsse auf die Kultur veränderten. Wie sich anhand mehrerer Fibroblastenlinien zeigen ließ, waren die während der verlängerten Kultur der Zellen aufgetretenen EH-Aktivitätsänderungen nicht für alle untersuchten Zelllinien gleich groß. Drei der sechs Zelllinien zeigten hohe Unterschiede (30 - 70%), während die drei übrigen nur niedrige Abweichungen (3,6 - 7,6%) aufwiesen. Die durchschnittliche Varianz der GSHT-Aktivität dagegen lag mit 5,9% im Bereich der mittleren Varianzen, die sich durch die Messung und die Lagerung ergeben hatten (Tabelle 6).

4.2.1.5. Unterschiede der Enzymaktivitäten in unabhängigen Fibroblastenkulturen aus verschiedenen Biopsien desselben Donors

Als Versuch zur Darstellung der Unabhängigkeit der Enzymaktivitäten vom Ort der Zellgewinnung wurden in dieser Messreihe 10 Kulturen von Hautfibroblasten derselben Person, jedoch verschiedener Herkunftslokalisationen in zwei zeitlich unabhängigen Versuchsreihen angelegt und jeweils nach der 5. Subkultur gemessen. Hierbei ergab sich, wie Abb. 12 zeigt, daß exogene Einflüsse die Aktivität der EH in allen Kulturen der zweiten Versuchsgruppe gleichsinnig beeinflussten, was sich durch eine mitgeführte Referenzkultur einer anderen Person bestätigen ließ. Außerdem ergab dieser Versuch eine Varianz der EH-Aktivität von 10,9 und 14,0% sowie der GSHT-Aktivität von nur 6,7 bzw. 6,0% für jeweils die erste bzw. die zweite Gruppe (Abb. 12;13).

Tabelle 6 : Unterschiede der Enzymaktivitäten nach mehr als 5 Subkulturen

Proband Nr.	Sub- kultur	EH-Aktivität [$\frac{\text{pmol BP-Diol}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	Abweichung [%]	GSH-Aktivität [$\frac{\text{nmol GSH-Konjugat}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	Abweichung [%]
1	5.	155,1 $\pm$ 15,4		68,3	
	9.	263,7 $\pm$ 15,8	+70,0	73,7	+7,9
12	5.	251,7 $\pm$ 8,8		56,8	
	8.	263,3 $\pm$ 17,4	+4,6	65,8	+15,8
15	5.	309,4 $\pm$ 19,8		68,3	
	9.	221,0 $\pm$ 27,2	-28,6	57,8	-15,3
16	5.	234,7 $\pm$ 4,2		57,2	
	9.	252,6 $\pm$ 37,6	+7,6	61,7	+7,9
17	5.	167,5 $\pm$ 19,8		57,9	
	8.	267,8 $\pm$ 4,6	+59,9	58,6	+1,2
18	5.	252,0 $\pm$ 13,4		76,7	
	8.	243,0 $\pm$ 20,7	-3,6	78,1	+1,8
Mittel	-	-	+18,3		+3,2

Änderung der Enzymaktivitäten derselben Zelllinie durch 3-4 Subkulturen. Die mittleren Varianzen betragen für die EH 17,4% und für die GSHT 5,9%.

Referenzzelllinie (HG7)
 Zelllinien verschiedener
 Biopsien derselben Person

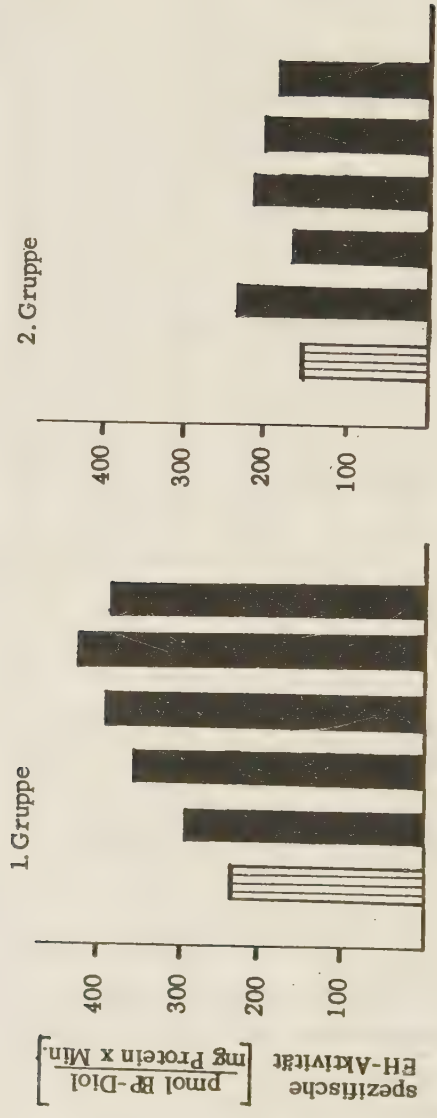


Abb. 12 : Vergleich der EH-Aktivität in Fibroblasten aus verschiedenen Biopsien derselben Person.

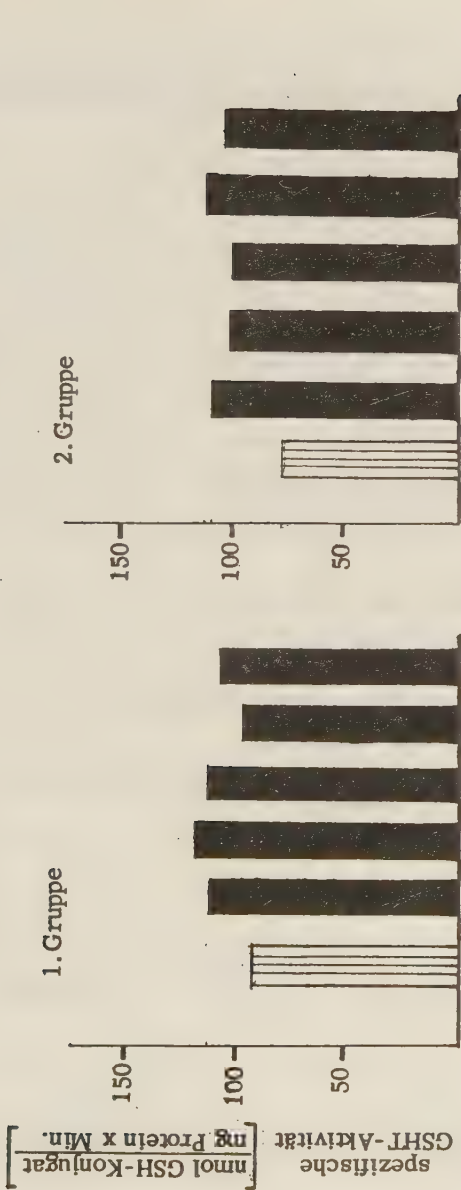


Abb. 13 : Vergleich der GSHT-Aktivität in Fibroblasten aus verschiedenen Biopsien derselben Person.

Tabelle 6 : Zusammenfassende Darstellung der zur Varianz der Messungen beitragenden Faktoren

Versuchsbedingungen	mittlere Varianz der	
	EH-Aktivität	GSHT-Aktivität
1. Mehrmalige Bestimmung der Enzymaktivität einer Kultur	3,9%	3,6%
2. Bestimmung der Enzymaktivität vor und nach Einfrieren, Lagerung bei -20°C	3,8%	5,7%
3. Bestimmung der Enzymaktivität einer Zelllinie in Parallelkulturen	2,3%	6,6%
4. Bestimmung der Enzymaktivitäten nach der 5. und 8. bzw. 9. Subkultur	17,4%	5,9%
5. Bestimmung der Enzymaktivitäten in Zellkulturen aus verschiedenen Biopsien derselben Person	12,4%	6,3%
6. Bestimmung der Enzymaktivitäten in Zellen verschiedener Kulturdichte	19,1%*	18,6%**

Die Vorbereitungen und Messungen erfolgten unter den in 3.4. beschriebenen Bedingungen.

*) Die Aktivität nahm systematisch mit höherer Zelldichte zu.

4.2.2. Interindividuelle Unterschiede der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferaseaktivität

Nach Aufbau der Messmethode für beide zu untersuchenden Enzyme und der Abklärung von Einflußmöglichkeiten auf die Aktivitäten der EH und GSHT, wurden die Enzyme in Fibroblasten von 39 bzw 30 Probanden gemessen. Die Personenauswahl erfolgte mit Rücksicht auf die Zustimmung der Probanden zum Eingriff der Fibroblastengewinnung relativ unspezifisch. So ergaben sich innerhalb der Gruppe von 39 Personen 9 weibliche und 30 männliche Probanden, davon 10 Raucher, 4 Nichtraucher, 25 mit unbekannten Rauchgewohnheiten, 16 mit gesichertem Karzinom, 9 mit nachgewiesenem malignem Melanom und 14 Probanden ohne nachgewiesene Neoplasie. Das Alter der Personen lag zwischen 25 und 93 Jahren.

Die GSHT-Messungen konnten aufgrund zu geringer Proteinausbeute und einiger Ausfälle bei den Messungen nur an 30 der 39 zur EH-Messung angezüchteten Fibroblastenlinien durchgeführt werden. Tabelle 5 zeigt, daß Werte der absoluten EH-Aktivität zwischen 80, 2 und 312, 8 pmol BP-Diol / mg Protein / Min. in voneinander unabhängigen Versuchen gemessen wurden. Als relative Aktivitäten der jeweils mitgeführten Referenzkultur lagen diese jedoch nur noch zwischen 72, 1% und 165, 1% der Referenzaktivität. Für die GSHT-Aktivität (Tabelle 6) ergaben sich als absolute Umsatzraten Werte zwischen 32, 6 und 89, 2 nmol GSH-Konjugat / mg Protein / Min., wobei hier die relative, auf die für jeden Versuch mitgeführte Referenzkultur bezogene, Aktivität bei Werten zwischen 60, 1% und 141, 2% lagen. Vergleiche der Enzymaktivitäten der verschiedenen gebildeten Gruppen von männlichen und weiblichen Probanden, Rauchern und Nichtrauchern, Karzinom- und Melanompatienten sowie Probanden ohne maligne Neoplasie ließen, wie Tabelle 7 zeigt, keine signifikanten Unterschiede erkennen. Auch der Vergleich der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Lebensalter ließ keine Korrelation zu, wie auch die Aktivitäten beider Enzyme in keiner signifikanten Abhängigkeit voneinander standen (Abb. 16-18). Wie die Abbildungen 14 und 15 darstellen, scheinen die EH- und GSHT-Aktivitäten um einen einzigen Gipfelwert, ungefähr nach einer Gauss'schen Verteilung zu liegen.

Tabelle 5 : EH-Aktivität in Fibroblastenkulturen von verschiedenen Probanden

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. EH-Aktivität [$\frac{\mu\text{mol BP-Diol}}{\text{mg Protein} \times \text{Min}}$]	rel. EH-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
1	1	♂	29	NR	-	126,7 $\pm$ 6,5	100,0
	1, 10, SK	♂	29	NR	-	144,4 $\pm$ 9,4	113,0
	2	♂	66		Ca	128,0 $\pm$ 11,3	101,0
	3	♂	64		Ca	149,1 $\pm$ 18,9	117,7
	4	♂	70		Ca	104,7 $\pm$ 9,5	82,6
	5	♂	75		Ca	112,3 $\pm$ 9,9	88,6
	6	♂	72		Ca	163,2 $\pm$ 14,6	132,8

Die in den Tabellen 5 und 6 aufgeführten Ergebnisse wurden nach insgesamt fünf Subkulturen bis zur Messung erhalten. Die Zelldichte der letzten Subkultur lag bei 200 000 Zellen/cm². Die Messungen wurden unter den in 3.4.6.1. und 3.4.6.3. beschriebenen Standardbedingungen durchgeführt.

Abkürzungen : spez. - spezifisch
rel. - relativ
R. - Raucher
NR - Nichtraucher
M - Melanom
Ca - Karzinom
SK - Subkultur
- - ohne bekannte Neoplasie

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. EH-Aktivität [$\frac{\text{pmol BP-Diol}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	rel. EH-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
2	1	♂	29	NR	-	124,6 ± 9,9	100,0
	1, 20. SK	♂	29	NR	-	145,3 ± 5,8	116,6
	7	♂	67		-	181,3 ± 16,4	145,5
	8	♂	59		Ca	140,6 ± 8,4	112,8
	9	♂	69		Ca	138,3 ± 23,5	111,0
	10	♂	73		Ca	109,5 ± 13,1	87,9
	11	♂	67		Ca	140,6 ± 4,5	112,8
3	1	♂	29	NR	-	263,7 ± 15,8	100,0
	12	♀	51		M	263,3 ± 17,4	99,8
	13	♂	63	R	-	312,8 ± 14,7	118,6
	14	♂	63	R	-	239,5 ± 10,3	90,8
	15	♂	93	R	-	221,1 ± 27,2	83,8
	16	♂	47		M	252,6 ± 37,6	95,8
	17	♀	30	R	-	270,1 ± 4,6	102,4
	18	♂	74		M	243,0 ± 20,7	92,2
	19	♂	49		M	190,1 ± 10,5	72,1

Fortsetzung von Tabelle 5 :

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. EH-Aktivität [$\frac{\text{pmol BP-Diol}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	rel. EH-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
4	1	♂	29	NR	-	80,2 ± 13,4	100,0
	1, 25. SK	♂	29	NR	-	95,2 ± 9,3	115,3
	20	♂	70	R	Ca	91,3 ± 3,9	113,8
	21	♂	81		Ca	101,5 ± 13,1	126,6
	22	♀	25	R	-	122,9 ± 9,3	153,2
	23	♂	67	R	-	104,0 ± 4,0	129,7
	24	♂	67		Ca	116,1 ± 3,6	144,8
	25	♂	67		Ca	105,8 ± 4,4	131,9
	26	♂	75		Ca	114,9 ± 11,6	143,3
	27	♀	25	R	-	103,8 ± 6,0	129,4
	28	♂	78		Ca	127,7 ± 9,2	159,2
	29	♂	45		Ca	85,7 ± 5,5	106,9

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewöhn- heiten	Neo- plasmen	spez. EH-Aktivität [$\frac{\text{pmol BP-Diol}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	rel. EH-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
5	1	♂	29	NR	-	169, 3 ± 13, 9	100, 0
	1, 31.SK	♂	29	NR	-	234, 9 ± 18, 1	138, 7
	30	♀	67		M	251, 7 ± 8, 8	148, 7
	31	♀	67		M	146, 5 ± 21, 5	86, 5
	32	♂	32	NR	-	216, 0 ± 19, 7	127, 6
	33	♀	35		M	125, 9 ± 5, 2	74, 4
	34	♀	59		M	252, 7 ± 7, 8	149, 2
	35	♀	73		M	279, 6 ± 21, 0	165, 1
	36	♂	36	R	-	167, 0 ± 13, 5	98, 6
	37	♂	66	R	-	137, 9 ± 9, 5	81, 4
	38	♂	72	NR	-	227, 9 ± 21, 2	134, 6
	39	♂	36	NR	-	254, 2 ± 14, 0	150, 1

Tabelle 6 : GSHT-Aktivität in Fibroblastenkulturen von verschiedenen Probanden

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. GSHT-Aktivität $\left[\frac{\text{nmol GSH-Konjugat}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}} \right]$	rel. GSHT-Aktivität $\left[\frac{\% \text{ der Referenz-}}{\text{aktivität}} \right]$
1	1	♂	29	NR	-	63,2	100,0
	1,10.SK	♂	29	NR	-	60,7	96,0
	7	♂	67		-	59,2	93,7
	10	♂	73		Ca	89,2	141,2
	11	♂	67		Ca	38,0	60,1
2	1	♂	29	NR	-	74,0	100,0
	12	♀	51		M	59,1	80,0
	13	♂	63	R	-	71,3	96,4
	14	♂	63	R	-	86,8	117,3
	15	♂	93	R	-	57,8	78,1
	16	♂	47		M	61,7	83,4
	17	♀	30	R	-	58,6	79,2
	18	♂	74		M	78,1	105,5
	19	♂	49		M	65,1	88,0

Tabelle 6 : GSHT-Aktivität in Fibroblastenkulturen von verschiedenen Probanden

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. GSHT-Aktivität [$\frac{\text{nmol GSH-Konjugat}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	rel. GSHT-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
3	1	♂	29	NR	-	49,0	100,0
	1, 25.SK	♂	29	NR	-	42,2	86,1
	20	♂	70	R	Ca	35,1	71,6
	22	♀	25	R	-	52,4	106,9
	23	♂	67	R	-	57,0	116,3
	24	♂	67		Ca	35,1	71,6
	25	♂	67		Ca	33,3	68,0
	26	♂	75		Ca	57,4	117,1
	27	♀	25	R	-	47,4	96,7
	28	♂	78		Ca	32,6	66,5
	29	♂	45		Ca	34,3	70,0

Tabelle 6 : GSHT-Aktivität in Fibroblastenkulturen von verschiedenen Probanden

Messung Nr.	Proband Nr.	Geschlecht	Alter [Jahre]	Rauch- gewohn- heiten	Neo- plasmen	spez. GSHT-Aktivität [$\frac{\text{nmol GSH-Konjugat}}{\text{mg Protein} \times \text{Min.}}$]	rel. GSHT-Aktivität [% der Referenz- aktivität]
4	1	♂	29	NR	-	69,0	100,0
	1, 31.SK	♂	29	NR	-	75,3	109,1
	30	♀	67		M	52,2	75,7
	31	♀	67		M	47,5	68,8
	32	♂	35	NR	-	79,5	115,2
	34	♀	59		M	50,5	73,2
	35	♀	73		M	78,1	113,2
	36	♂	36	R	-	50,2	72,8
	37	♂	66	R	-	59,7	86,5
	38	♂	72	NR	-	77,5	112,3
	39	♂	36	NR	-	61,2	88,7

Tabelle 7 : Vergleich der aufgestellten Gruppen in bezug auf ihre Enzymaktivitäten

Gruppenmerkmal	Zahl	rel. EH-Aktivität $\pm$ SD % der Referenz- aktivität	t-Test	Zahl	rel. GSHT-Aktivität $\pm$ SD % der Referenz- aktivität	t-Test
Männer	30	113, 2 $\pm$ 23, 4	p>0, 1	22	91, 8 $\pm$ 21, 6	p>0, 1
Frauen	9	123, 2 $\pm$ 33, 0		8	86, 7 $\pm$ 16, 6	
Raucher	10	110, 2 $\pm$ 23, 0	p>0, 1	10	92, 2 $\pm$ 17, 2	p>0, 1
Nichtraucher	4	128, 1 $\pm$ 20, 9		4	104, 5 $\pm$ 12, 2	
Karzinom- patienten	16	117, 1 $\pm$ 21, 7	p>0, 1	8	83, 3 $\pm$ 29, 3	p>0, 1
Neoplasiefreie Frobanden	14	117, 6 $\pm$ 24, 6		14	97, 2 $\pm$ 15, 0	
Melanom- patienten	9	109, 3 $\pm$ 35, 3	p>0, 1	8	86, 0 $\pm$ 15, 7	p>0, 1
Neoplasiefreie Probanden	14	117, 6 $\pm$ 24, 6		14	97, 2 $\pm$ 15, 0	
Gesamt	39	115, 5 $\pm$ 25, 8		30	90, 5 $\pm$ 20, 2	

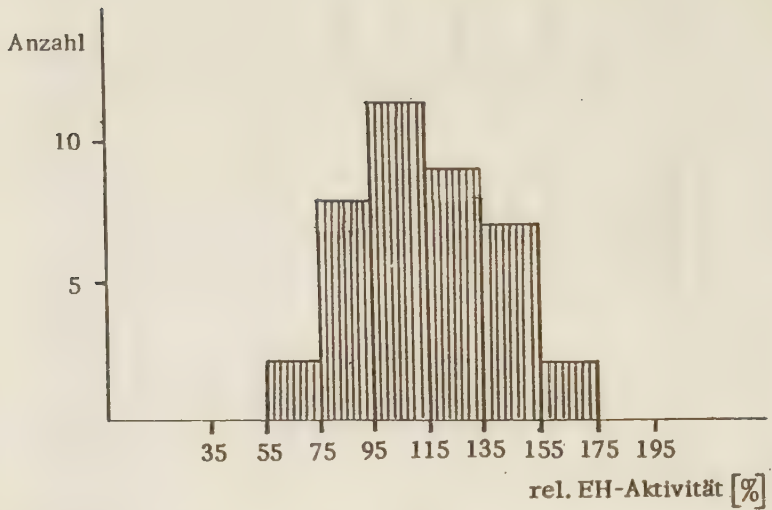


Abb. 14 : Häufigkeitsverteilung der relativen EH-Aktivität in Fibroblastenkulturen von 39 Probanden.

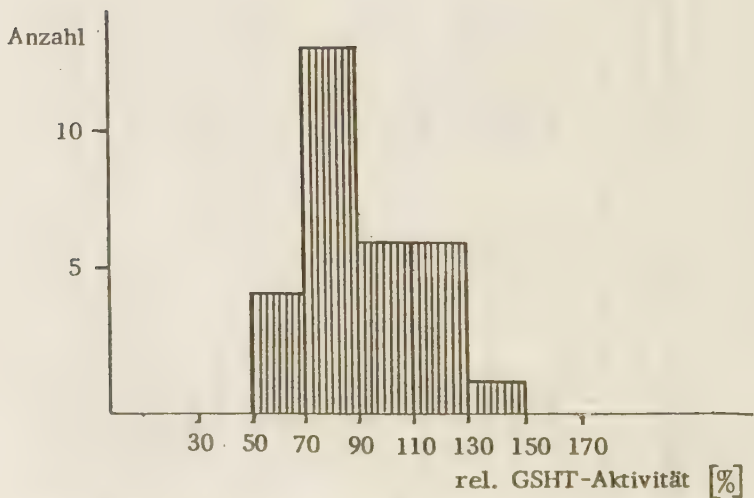


Abb. 15 : Häufigkeitsverteilung der relativen GSHT-Aktivität in Fibroblastenkulturen von 30 Probanden.

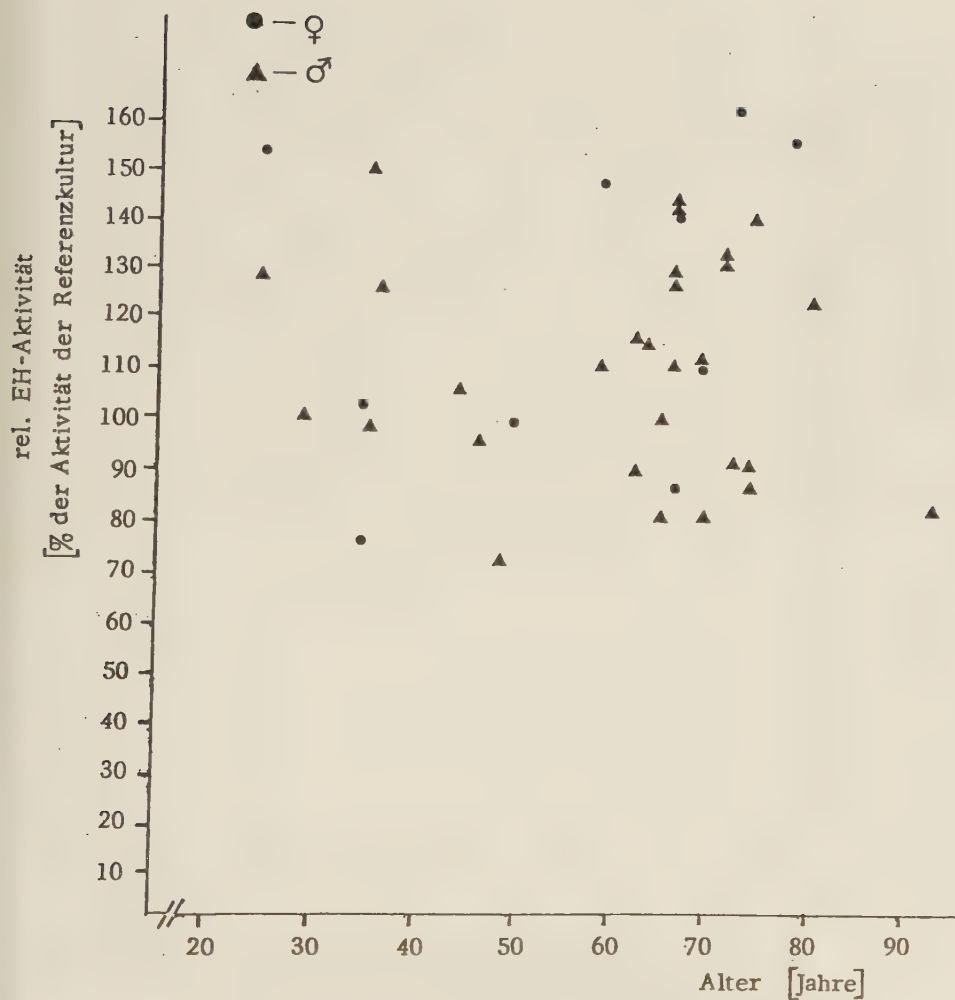


Abb. 16 : Altersverteilung der relativen EH-Aktivitäten von 39 Probanden. ($r = 0,035$)

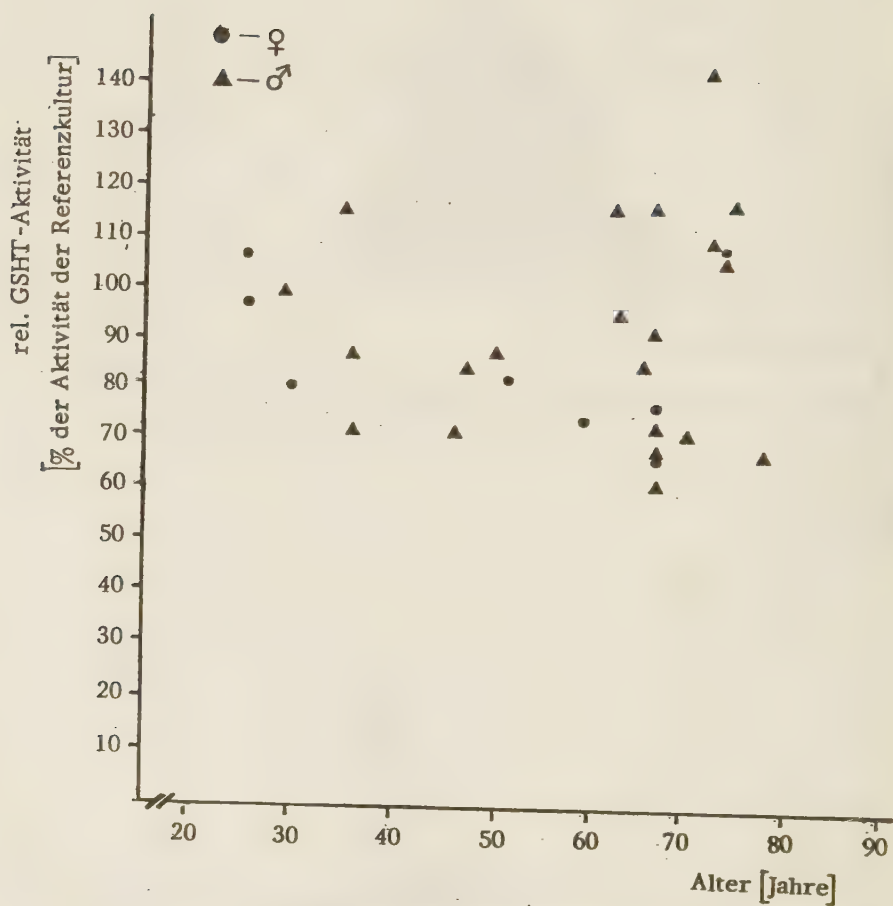


Abb. 17 : Altersverteilung der relativen GSHT-Aktivitäten von 30 Probanden. ($r = -0,004$)

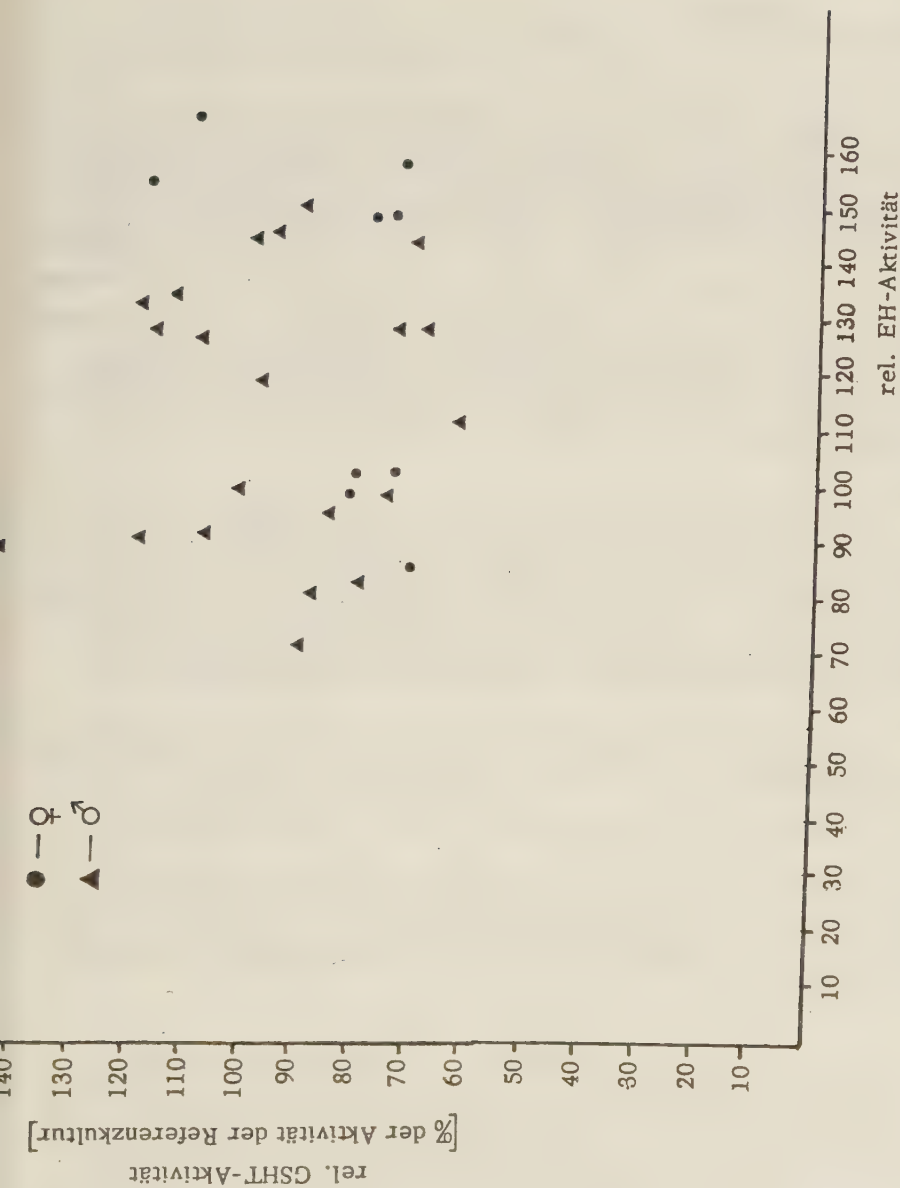


Abb. 18 : Darstellung der rel. EH-Aktivitäten
in Abhängigkeit der jeweiligen rel. GSHT-Aktivitäten. ($r = 0,166$)

5. DISKUSSION

Aufgrund epidemiologischer und experimenteller Untersuchungen konnte bisher in vielen Fällen eine eindeutige Korrelation zwischen der Einwirkung kanzerogener Substanzen und der folgenden Tumorentstehung aufgestellt werden (45). Doch bleibt weiterhin ungeklärt, warum trotz gleicher exogener Bedingungen die Konsequenz in bezug auf maligne Entartung nicht immer einheitlich ist. So stellt die Tumorentstehung keine unbedingte Folge der Einwirkung kanzerogener Noxen dar. Als Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens werden verschiedene Möglichkeiten von dispositionellen als auch genetischen Faktoren diskutiert.

Erstens kommt auf Grund verschiedener endogener Faktoren, wie zum Beispiel des Alters und des Hormonstatus, eine individuell verschiedene Latenzzeit bis zur Tumormanifestation nach primär gleicher Tumorinduktion in Frage. Das heißt, ein prinzipiell gleiches Geschehen läuft aufgrund der genannten physiologischen Faktoren zeitlich individuell unterschiedlich ab.

Zweitens spielt die Erkennung und Elimination des durch kanzerogene Einwirkung veränderten Zellmaterials eine bedeutende Rolle. So kann zum Beispiel das defekte DNS-Reparatursystem, wie am Krankheitsbild der Xeroderma Pigmentosum gezeigt wurde (44), zur Tumorentwicklung prädisponieren. Weiterhin sind immunologische Faktoren von Bedeutung. Hier können Unterschiede in der spezifischen Reaktion auf die als Antigen erkannten Tumorzellen bestehen.

Eine dritte Gruppe von Möglichkeiten zur Erklärung unterschiedlicher Reaktionen auf die Einwirkung von chemischen Kanzerogenen bildet der Metabolismus dieser Substanzen. Für ein weites Spektrum kanzerogener Verbindungen bedeutet dieses interindividuelle Unterschiede in der Bildung reaktiver Epoxide durch das aktivierende Monooxygenasesystem, oder Unterschiede im Abbau dieser gefährlichen Metabolite durch die Epoxidhydratase und die Glutathion-S-Transferasen.

Für derartige Variationen der Enzymaktivitäten kommen zwei Entstehungsmechanismen in Betracht: Der erste besteht in einer durch exogene Faktoren, wie diätetischer Einflüsse und Schadstoffeinwirkung, bedingten Modulation der beteiligten Enzymsysteme anhand von Induktion, Aktivierung oder Inhibition (10, 21, 23, 27, 28). Der zweite Entstehungsmechanismus besteht in einer genetischen Fixierung der Aktivität und Induzierbarkeit dieser Enzyme (31, 33-38).

Die Erfassung dieser genetisch bedingten Aktivitätsunterschiede, ein Ziel der vorliegenden Arbeit, setzt jedoch eine Methode voraus, die eine von exogenen Einflüssen weitgehend unabhängige Enzymmessung ermöglicht. Ein geeignetes Vorgehen, wie es auch zur Routineuntersuchung auf spezielle genetische Stoffwechseldefekte eingesetzt wird, stellt die Enzymmessung in kultivierten Fibroblasten dar (30). Das erste Ziel dieser Arbeit war es nun, geeignete Messbedingungen für die EH und GSHT in kultivierten Humanfibroblasten zu finden und die erhaltenen Ergebnisse auf ihre Reproduzierbarkeit hin zu überprüfen. Dazu wurde die Größenordnung der intraindividuellen Aktivitätsunterschiede erfaßt, und die darauf Einfluß nehmenden Faktoren untersucht. Erst durch diese Ergebnisse wurde es möglich, die Reliabilität eventueller interindividueller Aktivitätsunterschiede zu bestimmen und diese miteinander zu vergleichen.

Zur Bestimmung der EH-Aktivität in Fibroblasten konnte die Methode von H.Schmassmann et al.(41) unmodifiziert übernommen werden. Bei einer ausreichenden Reproduzierbarkeit lagen die Messungen im Bereich der linearen Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Inkubationszeit und der Proteinkonzentration. Zur Überprüfung der Validität dieser Messungen wurde die spezifische Inhibition der EH mit TCPO durchgeführt, welche mit einer fast vollständigen Hemmung des Substratumsatzes die Spezifität der Messungen bestätigte (12). Außerdem konnte, wie Versuch 4.1.2. zeigt, als weiteres Charakteristikum der EH eine Aktivierung des Enzyms durch α -Naphthoflavin auf mehr als das Doppelte nachgewiesen werden.

Für die Bestimmung der GSHT wurde zum Zweck der direkten Vergleichbarkeit der Substratumsätze versucht, die Messung mit BP-Oxid als Substrat nach der Methode von H. Glatt und F. Oesch (21) durchzuführen. Es ergab sich jedoch für den Substratumsatz keine zeitlich lineare Abhängigkeit. Durch die Verkürzung der Inkubationszeiten aber blieb der enzymatische Substratumsatz unter dem mitgeführten Leerwert. Einer Erhöhung des Proteineinsatzes bei kürzeren Inkubationszeiten, um einen ausreichend hohen Umsatz zu erhalten, sprach jedoch die fehlende Linearität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration entgegen. Somit war diese Methode mit dem zur Verfügung stehenden BP-Oxid als Substrat unter weiterer Verkürzung der Inkubationszeiten und Verminderung der Proteinkonzentration zur Annäherung an lineare Reaktionsverläufe nicht durchführbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der GSHT-Aktivität bot die Methode von Habig et al. (42) mit DNCB als Substrat. Wie in 4.1.4. gezeigt verlief die Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit und der Proteinkonzentration für den gewünschten Bereich linear. Die mittlere Varianz der Einzelmessung lag mit 3,6% in Höhe der Varianz der EH-Bestimmung.

Da die einzelnen Fibroblastenlinien ein unterschiedliches Dichtewachstum während der Kultur zeigten, wurde untersucht, ob das Dichtewachstum bzw. die Teilungsaktivität einen Variationsfaktor für die Enzymaktivitäten einer Zelllinie darstellen könnten. Hierfür wurde, wie Versuch 4.1.5. zeigt, festgestellt, daß der Dichteunterschied von 50 000 auf 200 000 Zellen pro cm^2 in ein und derselben Zelllinie eine systematische Änderung der EH- und GSHT-Aktivität zur Folge hat, wobei die größte Aktivität beider Enzyme jeweils bei der höchsten Zellkonzentration gemessen wurde. Es ist also anzunehmen, daß die Enzymaktivität der EH und GSHT von der Teilungsaktivität der Zellen abhängt. Das setzt zur Messung maximaler Enzymaktivitäten möglichst hohe Zelldichten voraus. Eine Zellkonzentrierung von 200 000/ cm^2 stellte jedoch die Grenze für ein gleichmäßiges Absetzen und Anwachsen der Zellen auf dem Kulturflaschenboden dar. Wäre dieses bei größerer Zellzahl nicht mehr gewährleistet, würde dadurch der erwünschte homogene Funktionszustand der Fibroblasten aufgehoben und ein Aktivitätsvergleich erschwert.

Weiterhin war zu überprüfen, ob sich die Fibroblasten einzelner Personen bei gleicher Zellkonzentration von $200\,000/\text{cm}^2$ identisch verhielten bzw. in gleichem Maße in ihrer Teilungsaktivität gehemmt waren. Es sollte ausgeschlossen werden, daß bei dieser, zur Standardisierung vorgenommenen Zellkonzentrierung, gemessene interindividuelle Aktivitätsunterschiede der Enzyme nicht durch eine stark variierende Teilungsaktivität der Fibroblasten verschleiert werden. Der zur Beantwortung dieser Fragestellung durchgeführte (^3H)-Thymidin-Inkorporationsversuch in Abhängigkeit von der Zelldichte ließ erkennen, daß sich die Teilungsaktivität aller untersuchten Zelllinien in niedrigen Konzentrationsbereichen mit zunehmender Dichte stark veränderte, was einer großen Fehlermöglichkeit bei der Enzymmessung entsprach, um bei höheren Zelldichten von etwa $200\,000/\text{cm}^2$ einer interindividuell nur noch gering unterschiedlichen Thymidin-Inkorporation entgegenzustreben. Diese konnte auch durch weitere Zellkonzentrierung nicht aufgehoben werden. Als Erklärung dafür kommen ein unterschiedlicher Prozentsatz anwachsender Zellen, unterschiedliche Kontaktinhibition der einzelnen Fibroblastenlinien sowie ein variierender Tritiumaustausch am Thymidin und weitere exogene Einflußfaktoren in Frage. Ein unterschiedlicher aktivierender Einfluß auf die Zellteilung durch Wachstumsstoffe des fötalen Kälberserums (46, 47) konnte ausgeschlossen werden, indem nur gepooltes Serum einer Charge für sämtliche Versuche benutzt wurde. Der Einfluß dieser geringen, verbleibenden Teilungsunterschiede auf die Enzymaktivitäten konnte jedoch in Hinsicht auf das Ziel dieser Arbeit, der Erfassung stoffwechselwirksamer, zur Kanzerogenese beitragender interindividueller Enzymaktivitätsunterschiede, als vernachlässigbar angesehen werden.

Aufgrund des unterschiedlichen Wachstums der einzelnen Zelllinien sowie der nicht synchron durchführbaren Anzüchtung aller zu untersuchenden Proben wurde es nötig, das zur Messung vorbereitete Zellhomogenat aufzubewahren, d.h. einzufrieren, um später, während einer Messung, die Aktivität mehrerer Zelllinien gleichzeitig zu bestimmen. Um den Einfluß dieser Lagerung auf die Enzymaktivitäten zu erfassen, wurden für mehrere Fibroblastenlinien Vergleichsmessungen durchgeführt. Die sich hierbei er-

gebenden Abweichungen fielen in den Bereich der Streuung der Einzelmessungen, erhöhten also den Fehler der Enzymbestimmungen nicht.

Ein weiterer Faktor, der zur Varianzerhöhung der Enzymmessungen beitragen konnte, bestand in eventuellen Unterschieden in der Anzüchtung der zuvor tiefgefrorenen Zellen. Um diese zu erfassen, wurden von verschiedenen Zelllinien jeweils drei getrennte Kulturen angelegt und auf ihre Enzymaktivitäten untersucht. Die mittlere Varianz beider Enzymmessungen für diese parallelen Anzüchtungen hoben sich nicht von der Streuung der Einzelbestimmungen ab. Erst eine höhere Zahl von Subkulturen brachte, wie der Versuch in 4.2.1.4. zeigt, wesentlich stärkere Abweichungen für die EH-Aktivität einiger Zelllinien mit sich, während die Streuung der GSHT-Bestimmung in diesem Versuch der Messgenauigkeit entsprach. Somit wurde das Risiko einer schlechteren Reproduzierbarkeit der EH-Aktivitätsbestimmung durch vermehrte Subkulturen beträchtlich erhöht. Als Ursache hierfür sind möglicherweise Induktion, Aktivierung oder aber Inhibition der EH sowie toxische und selektive Effekte oder auch nicht zu erkennende infektiöse Einflüsse durch Viren und Mykoplasmen zu diskutieren. Die letztgenannte Möglichkeit erhielt besonders durch die beträchtlich erhöhte Varianz der Aktivitäten nur einzelner Zelllinien spezielle Bedeutung.

Als letzter Versuch zur Überprüfung der Reliabilität der Enzymbestimmungen wurden unabhängige Fibroblastenkulturen verschiedener Biopsieorte eines einzigen Probanden auf die Gleichheit ihrer Enzymaktivitäten untersucht. In diese Messungen gingen nicht nur mögliche Unterschiede durch die Fibroblastengewinnung ein, sondern auch eventuell vorbestehende topisch wirksam werdende Faktoren im Probanden sowie exogene Einflüsse während der Kultur. Auch unter diesen Bedingungen lag die Varianz für die GSHT-Bestimmung im Bereich der vorhergehenden Versuche, während sie für die EH-Bestimmung etwa doppelt so hoch ermittelt wurde. - Ein weiteres Beispiel für die stärkere Beeinflussbarkeit der EH-Aktivität in kultivierten Humanfibroblasten.

Anhand der Ergebnisse dieser Versuche wurden die Messungen der EH- und GSHT-Aktivität in kultivierten Hautfibroblasten folgendermaßen standardisiert : Nach synchroner Anzüchtung möglichst vieler zu untersuchender Zelllinien während einer möglichst kurzen Kulturdauer wurde die Teilungsaktivität der Zellen durch Konzentrierung auf etwa $200\,000/\text{cm}^2$ weitgehend eingeschränkt, woran sich 48 Stunden später die Enzymaktivitätsbestimmungen anschlossen.

Nach diesen Voruntersuchungen wurden nun Vergleiche der EH- und GSHT-Aktivitäten an einer ausgewählten Population von Probanden durchgeführt. Um eventuelle, während der Kultur auftretende Aktivitätsänderungen durch die oben genannten Faktoren erfassen zu können, wurde für jede Anzüchtungsgruppe (bis zu 10 Zelllinien) jeweils eine Zelllinie eines vorher bestimmten Probanden als Referenz mitangezüchtet. Da die Enzymaktivitäten dieser Referenzzelllinie von einer zur anderen Anzüchtung relativ stark schwankten (Tabellen 5 und 6), wurden die Enzymaktivitäten der übrigen Zelllinien zur besseren Vergleichbarkeit auch als relative Aktivitäten in bezug auf die Referenzkultur angegeben. Die gemessene interindividuelle Gesamtstreuung der absoluten spezifischen EH-Aktivität wurde hierdurch auf etwa die Hälfte eingeschränkt (Tabellen 5 und 6). Für die GSHT hingegen deckte sich die Streubreite der relativen Enzymaktivitäten mit dem Bereich der absoluten Aktivitätsunterschiede. Auch dieses Ergebnis macht deutlich, daß die EH einer wesentlich stärkeren Beeinflußbarkeit exogener Faktoren gegenüber belastet war als die GSHT.

Eine Auftragung der Häufigkeiten der relativen Enzymaktivitäten in einem Histogramm zeigte für beide Enzyme unimodale Verteilungen ohne sehr weite Streuungen.

Die Variabilitätskoeffizienten waren mit 22,3% für die EH und GSHT gleich. Die kleinere interindividuelle Variabilität von 12,4% für die EH und 6,6% für die GSHT lassen vermuten, daß in der Tat interindividuelle Unterschiede bestehen. Doch legen die unimodalen Häufigkeitsverteilungen und die relativ geringen Unterschiede in den Variabilitätskoeffizienten zwischen den intra-

und interindividuellen Aktivitätsverteilungen nahe, daß nicht unterschiedliche Allele in EH- und GSHT-Loci für die Unterschiede verantwortlich sein müssen, sondern diese könnten indirekte Effekte einer Vielzahl interindividueller Unterschiede im Zellstoffwechsel der Probanden sein.

Aktivitätsunterschiede, bedingt durch Faktoren wie Geschlecht, Rauchgewohnheiten und dem Bestehen maligner Tumore konnten, wie Tabelle 7 zeigt, nicht nachgewiesen werden. Auch konnten die Enzymaktivitäten weder mit dem Alter der Probanden noch miteinander korreliert werden (Abb. 16-18).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Viele polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe stellen Kanzerogene dar. Jedoch kann man sehr ausgeprägte Suszeptibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen feststellen. Auch beim Menschen scheinen Suszeptibilitätsunterschiede gegenüber der Kanzerogenität von Zigarettenrauch sehr wahrscheinlich. Unter einer großen Zahl verschiedener Mechanismen dürfte die interindividuell unterschiedliche Metabolisierung der aufgenommenen Substanzen nicht unwesentlich zu Suszeptibilitätsunterschieden in der chemisch induzierten Krebsentstehung beitragen. Dieser Vorstellung folgend, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Enzymsysteme, die Epoxidhydratase und die Glutathion-S-Transferase, untersucht, die beide am Abbau kanzerogener, reaktiver Metabolite maßgeblich beteiligt sind.

Um endogene und exogene Einflüsse durch hormonelle und diätetische Faktoren auf die Enzymaktivitäten weitgehend auszuschließen, wurde zur Auffindung interindividueller Enzymaktivitätsunterschiede ein Fibroblastenkultursystem benutzt, wie es auch zur Untersuchung einiger Stoffwechseldefekte angewandt wird.

Nach Aufstellung der Messmethoden sowie der Untersuchung möglicher Einflußfaktoren auf die Enzymaktivitäten konnte das System zur Messung der Enzyme mit einer Varianz von unter 15% standardisiert werden. Einen besonders großen Einfluß auf die Aktivität der gemessenen Enzyme hatte das Teilungsverhalten der Fibroblasten. Insgesamt erschien die EH stärker durch exogene Faktoren beeinflusbar zu sein als die GSHT.

Unter diesen Voraussetzungen wurden 39 verschiedene Zelllinien angezüchtet, alle auf ihre EH-Aktivität und 30 von ihnen auf ihre GSHT-Aktivität untersucht. Zwar konnten gewisse interindividuelle Unterschiede für beide Enzyme von maximal einem Faktor 2,3 festgestellt werden, doch ließen sich

keinerlei signifikante Korrelationen zwischen den Enzymaktivitäten und speziellen Merkmalen wie Geschlecht, Rauchgewohnheiten, Tumorerkrankungen oder Alter aufstellen. Auch ließen sich die Aktivitäten beider Enzyme nicht miteinander korrelieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Jahrbuch 1978 für die Bundesrepublik Deutschland, Herausgeber : Statistisches Bundesamt; Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart und Mainz 1979.
2. Higginson, J. : Present Trends in Cancer Epidemiology. Can. Cancer Conf. 8, 40-75, 1969.
3. Borneff, J. : Hygiene, ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974.
4. Miller, E. C. : Some Current Perspectives on Chemical Carcinogenesis in Humans and Experimental Animals: Presidential Address: Cancer Research 38, 1479-1496, 1978.
5. Pott, P. : Chirurgical Observations Relative to the Cancer of the Scrotum, London 1775. Natl. Cancer Inst. Monograph 10, 7-13, 1963.
6. Haddow, A. ; Kon, G. A. R. : Chemistry of Carcinogenic Compounds. Brit. Med. Bull. 4, 314-326, 1947.
7. Jerina, D. M. ; Daly, J. W. : Arene Oxides: A New Aspect of Drug Metabolism. Science 185, 573, 1974.
8. Sims, P. ; Grover, P. L. : Epoxides in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism and Carcinogenesis. Advanc. Cancer Res. 20, 165, 1974.
9. Heidelberger, C. : Chemical Carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44, 79, 1975.
10. Oesch, F. : Review Article: Mammalian Epoxide Hydrases: Inducible Enzymes Catalysing the Inactivation of Carcinogenic and Cytotoxic Metabolites Derived from Aromatic and Olefinic Compounds. Xenobiotica 3, 305-340, 1973.

11. Oesch, F. : Metabolic Transformation of Clinically Used Drugs to Epoxides: New Perspectives in Drug-Drug Interactions. *Biochem. Pharmacol.* 25, 1935, 1976.
12. Oesch, F. : Bedeutung verschiedener Enzyme in der Kontrolle mutagener und kanzerogener Polyzyklischer Kohlenwasserstoffe. *Der Hautarzt* 28, 563-573, 1977.
13. Jakoby, W. B. : The Glutathion-S-Transferases: A Group of Multi-functional Detoxification Proteins. *Advanc. Enzymol.* 46, 381-412, 1977.
14. Oesch, F. ; Bentley, P. ; Glatt, H. R. : Prevention of Benzo(a)pyrene-induced Mutagenicity by Homogeneous Epoxide Hydratase. *Int. J. Cancer* 18, 448-452, 1976.
15. Bentley, P. ; Schmassmann, H. ; Sims, P. ; Oesch, F. : Various Polycyclic Hydrocarbons as Substrates of Homogeneous and Microsome-Bound Epoxide Hydratase. *Eur. J. Biochem.* 69, 97-103, 1976.
16. Walker, C. H. ; Bentley, P. ; Oesch, F. : Distribution of Epoxide Hydratase in Different Vertebrate Species, Strains and Tissues Measured Using Three Substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 593, 427-434, 1978.
17. Gelboin, H. V. ; Kinoshita, N. ; Wiebel, F. J. : Microsomal Hydroxylases: Induction and Role in Polycyclic Hydrocarbon Carcinogenesis and Toxicity. *Federation Proc.* 31, 1298-1309 1972.
18. Oesch, F. : Purification and Specifity of a Human Microsomal Epoxide Hydratase. *Biochem. J.* 139, 77-88, 1974.
19. Nemoto, N. ; Gelboin, H. V. ; Habig, W. H. ; Ketley, J. N. ; Jakoby, W. B. : K-Region Benzo(a)pyrene-4, 5-oxide is Conjugated by Homogeneous Glutathione S-Transferases. *Nature* 255, 512, 1975.

20. Glatt, H. R. ; Oesch, F. : Inactivation of Electrophilic Metabolites by Glutathione S-Transferases and Limitation of the System due to Subcellular Localisation. Arch. Toxicol. 39, 87-96, 1977.
21. Bentley, P. ; Oesch, F. ; Glatt, H. R. : Dual Role of Epoxide Hydratase in Activation and Inactivation of Benzo(a)pyrene. Arch. Toxicol. 39, 65-75, 1977.
22. Rannug, U. ; Sundvall, A. ; Ramel, C. : The Mutagenic Effect of 1, 2-Dichloroethane on Salmonella Typhimurium I. Activation Through Conjugation with Glutathione in Vitro. Chem. -Biol. Interactions 20, 1-16, 1978.
23. Oesch, F. ; Jerina, D. M. ; Daly, J. ; Rice, J. : Induction, Activation and Inhibition of Epoxide Hydratase. Chem. -Biol. Interactions 6, 189-202, 1973.
24. Holder, G. ; Yagi, H. ; Dansette, P. ; Jerina, D. M. : Effects of Inducers and Epoxide Hydratase on the Metabolism of Benzo(a)-pyrene by Liver Microsomes and a Reconstituted System: Analysis by High Pressure Liquid Chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 71 No. 11, 4356-4360, 1974.
25. Diamond, L. ; Gelboin, H. V. : Δ -Naphtoflavon: An Inhibitor of Hydrocarbon Cytotoxicity and Microsomal Hydroxylase. Science 164, 1023-1024, 1969.
26. Bürki, K. ; Bresnick, E. : Effects of an Epoxide Hydratase Inhibitor on in vitro Binding of PCH to DNA and on Skin Carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst. 52, 785-788, 1974.
27. Cha, Y. ; Martz, F. ; Bueding, E. : Enhancement of Liver Microsome Epoxide Hydratase Activity in Rodents by Treatment with 2(3)-tert-Butyl-4-Hydroxyanisole. Cancer Res. 38, 4496-4498, 1978.
28. Benson, A. M. ; Batzinger, R. P. ; Ou, S. L. ; Bueding, E. ; Cha, Y. ; Talalay, P. : Elevation of Hepatic Glutathione S-Transferase Activities and Protection against Mutagenic Metabolites of B(a)P by Dietary Antioxidants. Cancer Res. 38, 4486-4495, 1978.

29. Cleaver, J. E. ; Bootsma, D. : Xeroderma Pigmentosum: Biochemical and Genetic Characteristics. *Ann. Rev. Genet.* 9, 19-38, 1975.
30. Nyhan, W. C. ; Sakati, N. O. : Genetic and Malinformation Syndroms in Clinical Medicine. Yearbook of Medical Publishers INC. Chicago, 1976.
31. Kellermann, G. ; Luyten-Kellermann, M. ; Shaw, C. R. : Presence and Induction of Epoxide Hydratase in Cultured Human Lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 712-716, 1973.
32. Kaplowitz, N. ; Spina, C. ; Graham, M. ; Kuhlenkamp, J. : Glutathion S-Transferase in Human Lymphoid Cell Lines and Fractionated Peripheral Leucocytes. *Biochem. J.* 169, 465-470, 1978.
33. Huberman, E. ; Sachs, L. : Metabolism of the Carcinogenic Hydrocarbon Benzo(a)pyrene in Human Fibroblasts and Epithelial Cells. *Int. J. Cancer* 11, 412-418, 1973.
34. Alvares, A. P. ; Leigh, S. ; Kappas, A. ; Levin, W. ; Conney, A. H. : Induction of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Human Skin. *Drug Metabolism and Disposition* 1, 386-389, 1973.
35. Yamasaki, H. ; Huberman, E. ; Sachs, L. : Metabolism of the Carcinogenic Hydrocarbon Benzo(a)pyrene in Human Fibroblasts and Epithelial Cells. *Int. J. Cancer* 19, 378-382, 1977.
36. Fox, C. H. ; Selkirk, J. K. ; Price, F. M. et al. : Metabolism of Benzo(a)pyrene by Human Epithelial Cells in Vitro. *Cancer Res.* 35, 3551-3557, 1975.
37. Harris, C. C. ; Autrup, H. ; Barrett, L. A. : Interindividual Variation in Binding of Benzo(a)pyrene to DNA in Cultured Human Bronchi. *Science* 194, 1067-1069, 1976.

38. Kaltenbach, E. : Epoxidhydratase in menschlichen Lymphozyten und Lymphoblasten. Messverfahren, Grundaktivitäten, Induzierbarkeit, interindividuelle Unterschiede. Inauguraldissertation der Medizin. Mainz 1979.
39. Paul, J. : Cell and Tissue Culture. Ed. 5, Churchill Livingstone, Edinburgh 1975.
40. Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. ; Randell, R. J. : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
41. Schmassmann, H. ; Glatt, H. R. ; Oesch, F. : A Rapid Assay for Epoxide Hydratase Activity with Benzo(a)pyrene-4, 5- (K-Region-) oxide as Substrate. Analytical Biochem. 74, 94-104, 1976
42. Habig, W. H. ; Pabst, M. J. ; Jakoby, W. B. : Glutathione S-Transferases. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139, 1974.
43. Eder, M. ; Gedigk, P. : Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie. 29. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1975.
44. Heidelberger, C. : Chemical Carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44, 79-121, 1975.
45. Milo, G. E. ; Malarkey, W. B. ; Powell, J. E. : Effects of Steroid Hormones in Fetal Bovine Serum on Plating and Cloning of Human Cells in Vitro. In Vitro 12, 23-30, 1976.
46. Lepkin, G. ; Rosenberg, M. ; Knecht, M. E. : Factors Affecting Growth of Normal and Malignant Cells in Vitro. Biochem. Pharmacol. 25, 1333-1337, 1976.

8. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Oesch für die Überlassung des Themas und für die großzügige und umfassende Betreuung meiner Arbeit sowie Herrn Dr. H. R. Glatt für seine bereitwillige Unterstützung und die fruchtbaren Diskussionen.

Weiterhin sei den Herren Dr. P. Bentley, M. Golan und D. Raphael gedankt für ihre freundliche Hilfe sowie Herrn A. Sparrow für die Synthese von BP-Oxid als Substrat meiner Messungen.

9. LEBENS LAUF

Am 20. Februar 1953 wurde ich, Friedrich K. Tegtmeyer, als Sohn des Studienrates Friedrich Tegtmeyer und seiner Ehefrau Edeltraud, geb. Karpa, in Duisburg-Hamborn als zweites von drei Kindern geboren. Von 1960-62 besuchte ich die Volksschule in Wehofen, Kreis Dienslaken, ab 1962, nach einem Umzug nach Hüttental-Geisweid, Kreis Siegen, die dortige Albert-Schweitzer-Volksschule und ab 1964 das Evangelische Gymnasium Hüttental. Nach einem Wohnortwechsel von Dreis-Tiefenbach, wo ich von 1964-68 wohnte, nach Klein-Winternheim bei Mainz, besuchte ich bis zum Abitur 1972 das Gutenberg-Gymnasium in Mainz. 1972 nahm ich das Studium der Humanmedizin in Frankfurt am Main auf, um es ab 1973 an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz fortzusetzen und bis 1979 zu beenden. Meine Zwischenprüfungen legte ich im März 1974, 1975 und im August 1978 ab. Meine Dissertation fertigte ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz in der Abteilung Molekularpharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Oesch in der Zeit von 1976-78 an. Das Praktische Jahr meiner medizinischen Ausbildung legte ich von 1978-79 an den Städtischen Krankenanstalten Idar-Oberstein mit dem Wahlfach der Pädiatrie ab.

